Thesis Title Development of an ELISA Strip for the Detection of α-Thalassemia Carriers

Author Mr. Somphon Phraephan

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon Chairperson

Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul Member

ABSTRACT

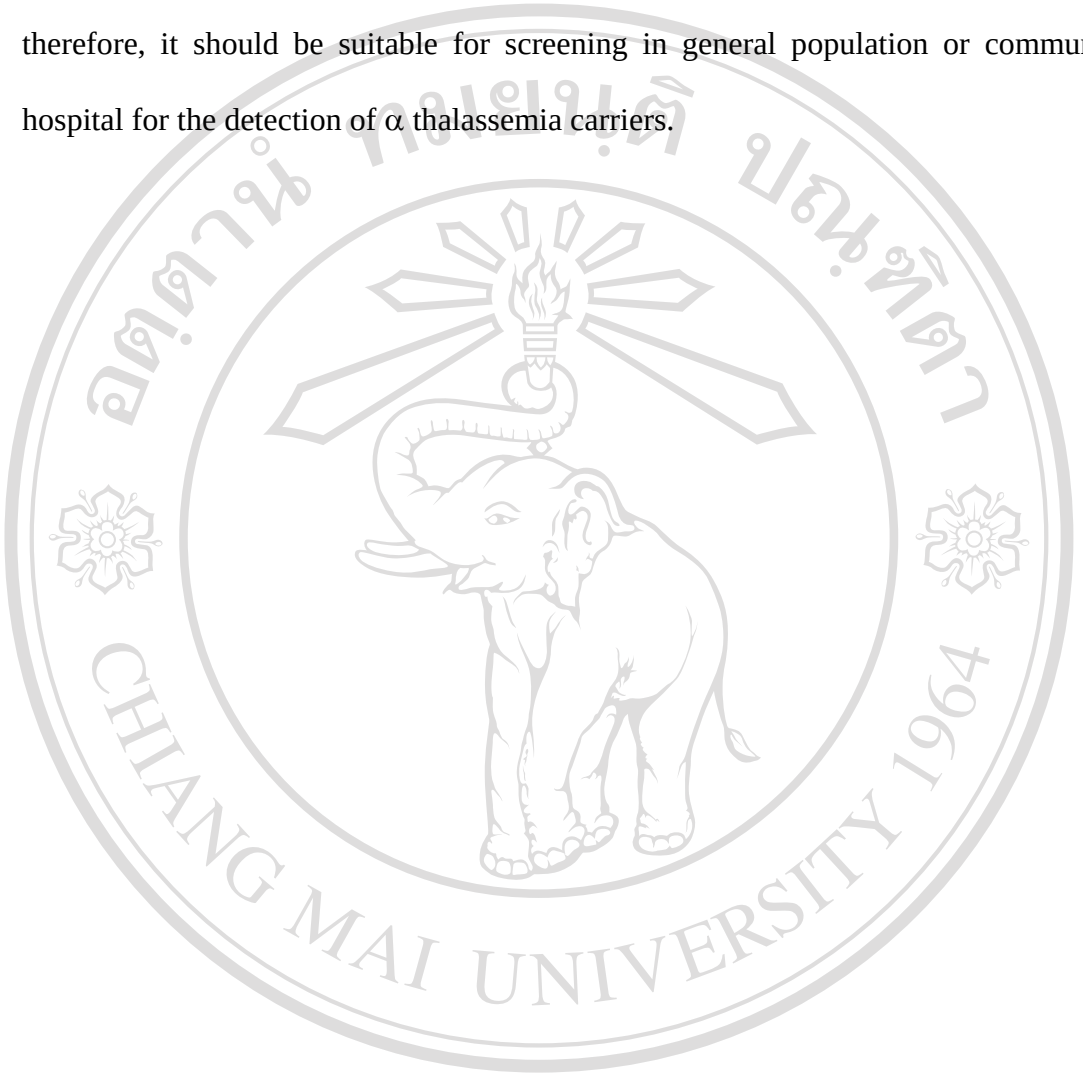
Thalassemia is an autosomal recessive inherited genetic disorder that causes the body to produce less hemoglobin. The α thalassemia occurs when one or more of four α globin genes that are vital making hemoglobin are deleted or mutated resulting less α globin chain synthesis. The interaction between α^0 thalassemia and α^+ thalassemia carriers leads to HbH disease. Particularly, the interaction between both α^0 thalassemia carriers leads to the most severe type of α thalassemia disease, Hb Bart's hydrops fetalis. Babies with this syndrome die either *in utero* or soon after birth. The identification of α thalassemia carriers and genetic counseling are essential for the prevention and control of this disease. Previous diagnosis of various types of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

α thalassemia were based on clinical pictures and hematological parameters such as Hb concentration, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) and percent of Hb Bart's. Introduction of DNA technology has enabled the diagnosis of all different forms of α thalassemia, however, this technology is mostly only available in more sophisticated laboratory. Determination of the level of Hb Bart's for diagnosis of α thalassemia was generally used in most laboratories. In this study, an ELISA strip was developed for the detection of Hb Bart's for the diagnosis of α thalassemia. Two clones of highly specific mouse anti-Hb Bart's monoclonal antibodies that bound to separated epitopes on Hb Bart's were used in the strip ELISA. Mouse mAb to Hb Bart's was spotted on a membrane. Hb Bart's in hemolysate will be captured by the coated mAb to Hb Bart's. Biotinylated mAb was added to bind Hb Bart's. The reaction could be detected by a streptavidin labeled with AP and the enzyme-substrate BCIP/NBT resulting a dark purple color spot on the membrane which visualized by the naked eye. Blood sample from 206 northern Thai were determined for α thalassemia carriers by the developed strip ELISA compared with conventional PCR. All 4 samples of HbH disease (1.9%), 22 samples of α^0 thalassemia (10.7%), 2 samples of homozygous α^+ thalassemia (1%), and 8 samples of nondeletional heterozygous α^+ thalassemia (HbCS) (3.9%) were positive to strip ELISA. No false negative were observed in these hemolysate samples. In heterozygous α^+ thalassemia, 90.6% (29/32) were positive to strip ELISA. Of 138 normal hemolysates, 115 samples were negative to the strip ELISA. Therefore, the sensitivity and specificity of the strip ELISA were 95.6% (65/68) and 83.3% (115/138), respectively. There were 16.7% (23/138) false positive and 4.4% (3/68)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

false negative. This study indicated that the developed ELISA strip had high sensitivity, high specificity, inexpensive and required no sophisticated equipment, therefore, it should be suitable for screening in general population or community hospital for the detection of α thalassemia carriers.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาแผ่นแถบอิไลซาเพื่อการตรวจหาพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย

ผู้เขียน นายสมพล แพรพันธ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเนื่องจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมในการสร้างฮีโมโกลบินทำให้ปริมาณฮีโมโกลบินลดน้อยลง แอลฟาธาลัสซีเมียมีสาเหตุจากการขาดหายไปหรือการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินทำให้การสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย การปฏิสัมพันธ์ระหว่างพาหะชนิดแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียและแอลฟาบวกธาลัสซีเมียทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอชซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง ส่วนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างพาหะชนิดแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียด้วยกันทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์ไฮดรอบฟีทาลิสซึ่งจะมีอาการโลหิตจางรุนแรงที่สุด ทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดนี้จะเสียชีวิตทั้งหมด อาจเสียชีวิตก่อนหรือหลังคลอดภายใน 24 ชั่วโมง การป้องกันและควบคุมโรคธาลัสซีเมียชนิดนี้คือการตรวจวินิจฉัยพาหะของอัลฟาธาลัสซีเมียและการให้ความรู้และคำแนะนำที่ถูกต้องเกี่ยวกับธาลัสซีเมียรวมทั้งการวางแผนครอบครัว ในอดีตการตรวจวินิจฉัยชนิดโรคธาลัสซีเมียใช้ลักษณะอาการทางคลีนิคและค่าโลหิตวิทยาเช่น ค่าฮีโมโกลบิน ค่า MCV ค่า MCH และปริมาณของฮีโมโกลบินบาร์ทส์ ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอมาตรวจแยกชนิดของแอลฟาธาลัสซีเมีย แต่ข้อจำกัดของเทคนิคทางดีเอ็นเอนั้นต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือที่จำเพาะและมีราคาแพง มีการศึกษาระดับฮีโมโกลบินบาร์ทส์ในเลือดสามารถนำมาใช้ตรวจหาโรคแอลฟาธาลัสซีเมียได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธีแผ่นแถบอิไลซาเพื่อใช้วินิจฉัยกลุ่มประชากรที่เป็นพาหะแอลฟาธาลัสซีเมีย โดยในการพัฒนาวิธีแผ่นแถบอิไลซานี้ใช้ โมโนโคนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อฮีโมโกลบินบาร์ทส์จำนวน 2 โคลนที่มีอีพิโทบต่างกันโดยโมโนโคนัลแอนติบอดีโคลนหนึ่งใช้จับกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฮีโมโกลบินบาร์ทส์และอีกโคลนหนึ่งซึ่งต่างอีพิโทบจะนำมาติดฉลากเข้ากับไบโอตินซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสเตรปตาไวดินที่ติดฉลากกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เมื่อทำปฏิกิริยากับสับเสตรทจะปรากฏสีแสดงผลบวกบนแผ่นแถบซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ขณะที่ผลลบไม่มีสี ในการศึกษานี้ทำการตรวจวินิจฉัยพาหะแอลฟาธาลัสซีเมียในกลุ่มอาสาสมัครที่มีภูมิลำเนาอยู่ในภาคเหนือจำนวน 206 ราย เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานโพลีเมอเรสเชนรีแอ็คชั่นพบว่าตัวอย่างอาสาสมัครเป็นโรคฮีโมโกลบินเอชจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 1.9) พาหะชนิดแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมียจำนวน 22 ราย (ร้อยละ 10.7) พาหะชนิดโฮโมไซกัสแอลฟาบวกธาลัสซีเมียจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1) และพาหะชนิดเฮทเทอโรไซกัสแอลฟาบวกธาลัสซีเมีย (ฮีโมโกลบินคอนแสตนท์สปริง) จำนวน 8 ราย (ร้อยละ 3.9)ให้ผลบวกกับวิธีแผ่นแถบอิไลซาโดยไม่พบผลลบปลอม ขณะที่พาหะชนิดเฮทเทอโรไซกัสแอลฟาบวกธาลัสซีเมียจำนวน 32 ราย (ร้อยละ 15.5)ให้ผลบวกกับวิธีแผ่นแถบอิไลซาจำนวน 29 ราย สำหรับตัวอย่างอาสาสมัครที่เป็นคนปกติจำนวน 138 ราย (ร้อยละ 67) ให้ผลลบกับวิธีแผ่นแถบอิไลซาจำนวน 115 ราย คิดเป็นค่าความไวของวิธีแผ่นแถบอิไลซาร้อยละ 95.6 (65/68) ค่าความจำเพาะร้อยละ 83.3 (115/138) ค่าผลบวกปลอมร้อยละ 16.7 (23/138) และค่าผลลบปลอมร้อยละ 4.4 (3/68) ดังนั้นวิธีแผ่นแถบอิไลซาที่พัฒนาขึ้นได้แสดงผลความไวของการทดสอบและผลความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังมีราคาถูก ไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า อาจจะนำไปใช้ตรวจกรองในกลุ่มประชากรจำนวนมากและสามารถนำไปใช้ในโรงพยาบาลและสถานีอนามัยที่ห่างไกลชุมชนได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved