

ฉบับ
ปรับปรุง
2558

คู่มือทางห้องปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยจักษุศาสตร์ซีเอ็มเอช และ ฮีโมโกลบินผิดปกติ



คู่มือทางห้องปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยจุลชีพ และ ฮีโมโกลบินผิดปกติ



ชื่อหนังสือ คู่มือทางห้องปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติ

จัดทำโดย คณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

จัดพิมพ์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ถ.ติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
โทร. 02 951 0000 ต่อ 99394
โทรสาร. 02 951 0000 ต่อ 99394

พิมพ์ครั้งที่ 1	มีนาคม	2552	1,000	เล่ม	พิมพ์ครั้งที่ 5	มีนาคม	2556	500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 2	มิถุนายน	2552	2,000	เล่ม	พิมพ์ครั้งที่ 6	มิถุนายน	2558	1,500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 3	สิงหาคม	2553	1,000	เล่ม	พิมพ์ครั้งที่ 7	กรกฎาคม	2558	500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 4	พฤษภาคม	2555	600	เล่ม	พิมพ์ครั้งที่ 8	กรกฎาคม	2562	500	เล่ม

พิมพ์ที่ : บริษัท หมัดเด็ด จำกัด

ถนนราษฎร์บูรณะ แขวงราษฎร์บูรณะ

เขตราษฎร์บูรณะ กรุงเทพฯ 10140

โทร 081 587 8145, 081 923 8145, 02 045 8145

www.knockoutblow.com

e:mail: yotawee@yahoo.com

ข้อมูลทางบรรณานุกรมของหอสมุดแห่งชาติ
คณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัย
โรคธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ.

คู่มือทางห้องปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติ.--นนทบุรี : ศูนย์วิจัยทางคลินิก
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553.

42 หน้า.

1. ธาลัสซีเมีย - การวินิจฉัย. 2. ฮีโมโกลบิน. 3. การวินิจฉัย
โรคทางห้องปฏิบัติการ. I. ชื่อเรื่อง.

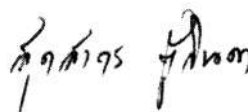
616.152075

ISBN : 978-616-11-0408-5

คำนิยาม

ดิฉันมีความยินดีเป็นอย่างยิ่งที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดพิมพ์คู่มือปฏิบัติงานด้านการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย ที่ทันสมัย ก้าวหน้า และมีคุณภาพ เพื่อใช้ในการฝึกอบรมและบริการตรวจโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียให้ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็วทั่วประเทศ จะทำให้แผนการควบคุม ป้องกัน และรักษาโรคนี้เป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่ง

ดิฉันขอขอบคุณท่านคณาจารย์ ผู้เชี่ยวชาญจากสถาบันต่างๆ ซึ่งร่วมมือกันสร้างคู่มือนี้ขึ้นมา ซึ่งจะเป็นคุณูปการประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและครอบครัว อันเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ



ศ. พญ. คุณหญิงสุดศกร ตูจันทา

ประธานมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทยฯ

คำนำ

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรค ผลการตรวจที่น่าเชื่อถือ และรวดเร็ว นับเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการรักษาและพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ตลอดจนการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยใหม่เพิ่มมากขึ้น

การให้บริการทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ถึงแม้จะดำเนินการมาแล้วเป็นเวลานาน แต่ยังคงขาดแนวทางปฏิบัติที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน ทำให้เกิดความแตกต่างในทางปฏิบัติ หากบุคลากรที่เกี่ยวข้องมีความเข้าใจที่ไม่ถูกต้อง จะส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียของประเทศได้

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในฐานะที่มีภารกิจหลักทางห้องปฏิบัติการ เพื่อสนับสนุนการแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศ จึงได้เรียนเชิญคณะผู้เชี่ยวชาญจากมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุข และมหาวิทยาลัยต่างๆ ร่วมกันจัดทำคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ เพื่อเผยแพร่ให้ทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้องถือปฏิบัติให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณคณะผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการจัดทำคู่มือฉบับนี้ ขอขอบคุณสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติที่สนับสนุนงบประมาณดำเนินการและหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้อันมีคุณค่าทั้งหมดจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพเครือข่ายห้องปฏิบัติการของประเทศ ให้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้อย่างมีคุณภาพ อยู่บนมาตรฐานเดียวกัน สามารถสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ



(นายแพทย์อภิชัย มงคล)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

มิถุนายน 2558



คณะผู้จัดทำ

นพ. อภิชัย มงคล

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-5899862 ต่อ 99001-2

ศ.เกียรติคุณ พญ. วรพรรณ ตันไพจิตร

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

โรงพยาบาลศิริราช

โทร. 02-4198329

รศ. พันเอก นพ.กิตติ ต่อจรัส

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ทหาร

โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

โทร. 02-6444888

ดร. อังคณา หิรัญสาลี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-9610000 ต่อ 99361

นพ.ชรินทร์ ลิ้มวงศ์

ภาควิชาอายุรศาสตร์

โครงการพัฒนาระบบสุขภาพ

สำหรับธาลัสซีเมีย โรงพยาบาลศิริราช

โทร. 02-4199488

ศ.เกียรติคุณ พญ.คุณหญิงสุดศพร คุ้มจินดา

มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย

แห่งประเทศไทย

โทร. 02-4198329

รศ.คลินิก พญ.วารุณี จินารัตน์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-5915231 ต่อ 99005-6

ดร.ปราณี ฟูเจริญ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล

มหาวิทยาลัยมหิดล

โทร. 02-8892557-8

นพ.สมชาย แสงกิจพร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-9510000 ต่อ 99355

รศ. ดร. สุพรรณ ฟูเจริญ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัย

ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทร. 043-202083



รศ. กุลนภา ฟูเจริญ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัย
ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
โทร. 043-202083

รศ. พญ.พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทร. 053-945412-5

อาจารย์ชวดี นพรัตน์

ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
โทร. 074-451562

นางสิริภากร แสงกิจพร

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
โทร. 02-9510000 ต่อ 99394

นางภัทราภรณ์ บุญพันธ์

งานโลหิตวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี
กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
โทร. 02-3548108 ต่อ 3620-1

รศ. ดร.ธัญศักดิ์ ตาตุ

ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยาและเทคโนโลยีสุขภาพ
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทร. 053-949288

ผศ. ดร.จำนงค์ นพรัตน์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
โทร. 074-451567

นางสาวรวงคณา อ่อนทรง

กองแผนงานและวิชาการ
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
โทร. 02-9510000 ต่อ 99014

นางสุทัศน์ีย์ วิมลเศรษฐ์

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
โทร. 043-240800

นางณัชชา หิริไธต้ปะ

ศูนย์อนามัยที่ 1 กรมอนามัย
กระทรวงสาธารณสุข
โทร. 02-5216550-2 ต่อ 105



นางบุษบา เตชะชัยนิรันดร์

ศูนย์อนามัยที่ 4 ราชบุรี

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 032-310368-71

นางสาวอัมรา โยวัง

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 053-176225-6 ต่อ 114

นางบุญนิภา สุวรรณกาล

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 อุตรธานี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 042-207364-6 ต่อ 110,106

ดร. พิไลลักษณ์ อัคคไพบูลย์ โอภาตะ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-9510000 ต่อ 99206,99305

นางอารีรัตน์ ขอไชย

สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

โทร. 02-9510000 ต่อ 99394



สารบัญ

แนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ	1
การตรวจคัดกรอง	3
- การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง	4
- การตรวจคัดกรอง ฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยน้ำยา DCIP	6
- การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง	8
การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing & Quantitation)	9
การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1	17
การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia	19
สรุปแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ และตารางแสดงชนิดธาลัสซีเมียของคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง	23
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	27

แนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

และ

ซีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

แนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์ฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพกับแทบทุกอวัยวะในร่างกาย ผู้ที่มียีนธาลัสซีเมียมีทั้งผู้ที่เป็นโรค และไม่เป็นโรค หรือพาหะ ผู้ที่เป็นโรคมีอาการแตกต่างกัน ตั้งแต่มีโลหิตจางเล็กน้อย โลหิตจางมาก เรื้อรัง ไปจนถึงอาการรุนแรงมาก จนเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา หรือหลังคลอดไม่นาน ส่วนผู้ที่เป็นพาหะมีสุขภาพปกติเหมือนคนทั่วไป แต่สามารถถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติไปสู่ลูกหลานได้

อุบัติการณ์ในประเทศไทยพบว่า ประชากรที่เป็นพาหะมีประมาณร้อยละ 30 - 40 หรือประมาณ 18-24 ล้านคน มีผู้ที่เป็นโรคประมาณร้อยละ 1 หรือประมาณ 6 แสนคน ในแต่ละปีจากหญิงตั้งครรภ์ประมาณ 1 ล้านคน มีหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียประมาณ 5 หมื่นคน และมีเด็กเกิดใหม่ป่วยเป็นโรคเพิ่มขึ้นประมาณ 12,000 คน ธาลัสซีเมียจึงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข ซึ่งไม่เพียงแต่มีผลต่อผู้ป่วยและครอบครัวเท่านั้น หากยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศอีกด้วย

การแก้ไขปัญหาโรคธาลัสซีเมียจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือของหน่วยงานต่างๆ ในการดำเนินการควบคุมและป้องกัน แผนการดำเนินการควบคุมและป้องกันโรค ประกอบด้วย การให้ความรู้แก่ประชาชนและบุคลากรทางสาธารณสุข การตรวจหาผู้ป่วยและพาหะ การให้คำปรึกษา แนะนำทางพันธุกรรม และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นับเป็นหน่วยงานที่มีบทบาทสำคัญ ทั้งในด้านการตรวจหาผู้ป่วยและพาหะ ตลอดจนการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ซึ่งให้ข้อมูลสำคัญนำไปใช้ในการให้คำแนะนำทางพันธุกรรม และช่วยในการตัดสินใจสำหรับสามีภรรยาคู่เสี่ยงที่มีโอกาสให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย ชนิดรุนแรง 3 โรค ตามนโยบายของ

กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis), homozygous β -thalassemia และ β -thalassemia/ Hb E

เนื่องจากชนิดของธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรไทยมีความหลากหลาย จึงไม่มีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่งทางห้องปฏิบัติการที่สามารถให้การวินิจฉัยได้ครอบคลุมความผิดปกติได้ทุกชนิด โดยทั่วไปการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสมี 3 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 การตรวจคัดกรอง (screening tests) เป็นขั้นตอนแรกที่มีเป้าหมายหลักในการคัดกรองเอาคนปกติหรือคนที่มีความผิดปกติชนิดที่ไม่รุนแรงออกไป เพื่อจะได้ไม่ต้องตรวจเลือดต่อและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย คงเหลือแต่ผู้ที่น่าจะมี ความผิดปกติของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่เข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ระดับที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินในเลือด (Hb typing) สามารถตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่ไม่ซับซ้อนได้เกือบทุกชนิดที่พบบ่อยในประเทศไทย ยกเว้นพาหะ α -thalassemia

ระดับที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) ใช้ในกรณีที่ผลการตรวจ Hb typing ในระดับที่ 2 ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ชัดเจน หรือกรณีต้องการทราบชนิดของมิวเตชันของธาลัสซีเมียที่วินิจฉัยได้ในระดับที่ 2 และกรณีการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

การดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการทุกขั้นตอนล้วนมีความสำคัญทั้งสิ้น บุคลากรที่เกี่ยวข้องควรพิจารณาให้เหมาะสมตามหลักวิชาการ และสอดคล้องกับข้อกำหนดด้านคุณภาพ เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ สามารถสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ



การตรวจคัดกรอง

การตรวจคัดกรอง

การตรวจคัดกรองเป็นการทดสอบอย่างง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง และบุคลากรที่มีความชำนาญมากนัก สามารถทำได้ในโรงพยาบาลทุกระดับ คลินิก และสถานเอนามัยต่าง ๆ การตรวจคัดกรองมีเป้าหมายหลักในการคัดกรองเอาคนปกติ หรือมีความผิดปกติชนิดที่ไม่รุนแรงออกไป เพื่อจะได้ไม่ต้องตรวจเลือดต่อและเป็น การประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นผลการตรวจคัดกรอง จะต้องมีความไวสูง อาจมีผลบวกปลอมได้บ้าง ราย ที่ผลการตรวจคัดกรองเป็นลบไม่จำเป็นต้องนำไป ตรวจยืนยันต่อ การตรวจคัดกรองจึงช่วยลดภาระงาน และค่าใช้จ่ายในการตรวจทางห้องปฏิบัติการลงได้ มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องดำเนินงานในกลุ่ม ประชากรขนาดใหญ่ในระดับประเทศ

ในประเทศไทยการตรวจคัดกรองที่เกี่ยวข้องในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข มี 3 การทดสอบ คือ

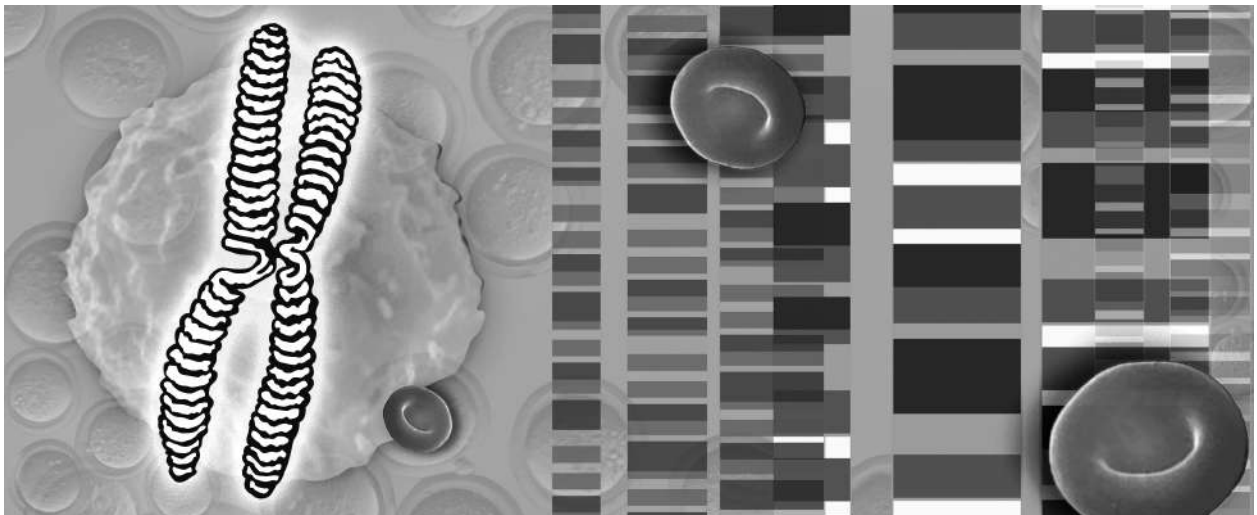
1. การตรวจ OF
2. การตรวจ DCIP
3. การตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง

การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประเทศไทยสามารถเลือกทำได้จาก 2 แนวทาง ดังนี้

แนวทางที่ 1 ประกอบด้วยการตรวจ osmotic fragility (OF) ร่วมกับการตรวจ dichlorophenolindophenol (DCIP) precipitation

แนวทางที่ 2 ประกอบด้วยการตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง (MCV, MCH) ร่วมกับการตรวจ dichlorophenolindophenol (DCIP) precipitation

การตรวจ OF และ MCV/ MCH ใช้ในการตรวจคัดกรอง ความผิดปกติที่มีสาเหตุจาก α -thalassemia และ β -thalassemia ส่วน DCIP ใช้ในการตรวจ Hb E



การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย

ด้วยการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง

(osmotic fragility test: OF test)

หลักการ

เม็ดเลือดแดงปกติเมื่ออยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้น ร้อยละ 0.85 จะคงสภาพปกติไว้ได้ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำเกลือลงเรื่อยๆ น้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เซลล์บวมขึ้น จนถึงความเข้มข้นของเกลือระดับหนึ่ง เม็ดเลือดแดงจะแตก การที่เม็ดเลือดแดงแตกง่าย (increased osmotic fragility) หรือแตกยาก (decreased osmotic fragility) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพื้นที่ผนังเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่คือ ฮีโมโกลบิน เม็ดเลือดแดงที่มีอัตราส่วนนี้สูง เช่น target cell และ hypochromic cell จะแตกยากในขณะที่ spherocyte จะแตกง่าย ดังนั้นในการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงปกติจะแตกได้หมด แต่เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและพาหะธาลัสซีเมียที่มี target cell และ hypochromic cell จะไม่แตกอย่างไรก็ตามภาวะอื่นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะเป็น hypochromic cell เช่น ภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก หรือเป็น target cell เช่น ในผู้ป่วยโรคตับสามารถให้ผลบวกปลอมได้

สารเคมีและน้ำยา

ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปหลายชนิดจำหน่าย การเลือกใช้ควรพิจารณาให้รอบคอบตามข้อกำหนดด้านคุณภาพ และข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ

วิธีการ

- เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่กำหนด

การรายงานผล

- เมื่อได้ผลลบ รายงานผล “Negative”
- เมื่อได้ผลบวก รายงานผล “Positive”

การแปลผล

Negative : ไม่เป็นธาลัสซีเมีย หรืออาจเป็นธาลัสซีเมียชนิดที่ไม่รุนแรง เช่น α -thalassemia 2, Hb Constant Spring, Hb Paksè

Positive : อาจเป็น α -thalassemia หรือ β -thalassemia โดย α -thalassemia มีโอกาสเป็นได้ทั้งชนิด α -thalassemia 1 และบางรายของ α -thalassemia 2 ส่วน β -thalassemia ก็อาจเป็นได้ทั้ง β^0 -หรือ β^+ -thalassemia เมื่อผลการตรวจเป็น positive ต้องส่งตัวอย่างเลือดตรวจ Hb typing และดีเอ็นเอต่อไป

ข้อจำกัดของการทดสอบ

1. การทดสอบ OF เป็นการตรวจคัดกรองที่มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรอง α -thalassemia 1 และ β -thalassemia เป็นหลักเท่านั้น ไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยชนิดของความผิดปกติได้
2. ผู้ที่เป็นพาหะ Hb E บางราย อาจให้ผลบวกบางรายอาจให้ผลลบกับการทดสอบนี้
3. อาจพบผลบวกลงในภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก และจากความผิดปกติอื่นๆ ที่พบ target cell เช่น โรคตับ

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำยาก่อนนำมาใช้ในงานบริการ โดยทำการทดสอบกับเลือดควบคุมคุณภาพ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกตัวอย่างเลือดควบคุมคุณภาพจากเลือดผู้ใหญ่ในงานประจำวัน ดังนี้

ตัวอย่างควบคุมผลลบ (Negative control)

MCV \geq 80 fL, MCH \geq 27 pg และ Hb > 13 g/dL (ผู้ชาย) หรือ Hb > 12 g/dL (ผู้หญิง)

ตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control)

MCV < 75 fL, MCH < 25 pg และ Hb > 11 g/dL (ผู้ชาย) หรือ Hb > 10 g/dL (ผู้หญิง)

เมื่อน้ำยาผ่านกระบวนการตรวจสอบคุณภาพก่อนใช้งานแล้วจึงนำไปใช้ให้บริการ โดยในการทำงานประจำให้แบ่งเก็บตัวอย่างเลือดที่ให้ผลการตรวจคัดกรองเป็นบวกและลบ อย่างละ 1-2 ตัวอย่าง ไว้ในตู้เย็น 4°C สำหรับใช้เป็นเลือดควบคุมคุณภาพน้ำยาสำหรับการทดสอบในวันต่อไป และเก็บใหม่วันต่อวันไปเรื่อย ๆ

2. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้ผลการตรวจผิดพลาดได้ เช่น ปริมาณเลือดกับ EDTA มีสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม ถ้าปริมาณเลือดน้อย EDTA เหลือมาก จะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงเหี่ยว (crenated RBC) จะให้ผลบวกปลอมต่อการทดสอบได้ในทำนองตรงข้ามถ้าเจาะเลือดมากเกินไป หรือผสมเลือดกับสารกันเลือดแข็งไม่ดี เลือดบางส่วนแข็งตัว (partial clot) ทำให้ผลการตรวจไม่ถูกต้อง

หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันทีหลังได้รับเลือด ควรเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีตู้เย็นต้องเก็บในกระติกที่มีน้ำแข็ง และทำการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเลือดเก่าเม็ดเลือดแดงบางส่วนมีการเสื่อมสภาพทำให้แตกง่าย เกิดผลลบปลอมได้

3. การควบคุมคุณภาพวิธีการทดสอบ

- น้ำยาที่เก็บในตู้เย็น ควรนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 15 นาที และเขย่าก่อนนำมาใช้งาน

- ปิเปตทิพ (pipette tip) ควรใช้ของใหม่ เนื่องจากปิเปตทิพที่นำมาล้างเพื่อใช้ใหม่ อาจมีสารตกค้างและไม่แห้งสนิท ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เกิดผลลบปลอมได้

- ไม่ควรใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ผสมเลือดกับน้ำยา เพราะจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจากแรงเหวี่ยงทำให้เกิดผลลบปลอมได้

- ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาก่อนอ่านผล จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียดในเอกสารกำกับน้ำยาอย่างเคร่งครัด เพื่อให้เม็ดเลือดแดงปกติแตกอย่างสมบูรณ์

4. การอ่านผลไม่ควรนำมาอ่านผลที่ละเอียด ควรใส่ rack ยกขึ้นอ่านที่ละเอียด ประมาณ 10-12 หลอด จะได้มีผลการทดสอบทั้งบวก และลบเปรียบเทียบไปพร้อมกัน โดยมีคอมไฟให้แสงพอดี (ไม่จ้าเกินไป) ส่องจากด้านบนลงมาที่หลอด ตัวอย่างที่ให้ผลขุ่นไม่ชัดเจน (weakly positive หรือ suspicious) มักเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ที่เป็นพาหะ Hb E บางราย และพาหะ α -thalassemia 2 สำหรับในกรณีที่เป็นพาหะ Hb E ถ้าทำการตรวจคัดกรอง DCIP ด้วย ตัวอย่างเหล่านั้นก็จะให้ผลบวกชัดเจนกับ DCIP

การตรวจคัดกรอง

ฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยน้ำยา DCIP

dichlorophenolindophenol precipitation test

หลักการ

Hb E ($\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu-Lys}}$) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 26 ของสาย β -globin เปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (glutamic : Glu) เป็นไลซีน (lysine : Lys) ทำให้โครงสร้างที่จุดสัมผัสระหว่างสายโกลบิน $\alpha_1\beta_1$ ไม่แข็งแรง เมื่ออยู่ในสารละลาย DCIP จะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นโกลบินสายเดี่ยวที่มีซัลไฟไฮดริลอิสระจึงตกตะกอนได้ง่าย และเร็วกว่าฮีโมโกลบินปกติ โดยปริมาณความขุ่นของตะกอนที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างเลือดของ Hb E homozygote จะมากกว่าของพาหะ Hb E

สารเคมีและน้ำยา

ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปหลายชนิดจำหน่าย การเลือกใช้ควรพิจารณาให้รอบคอบตามข้อกำหนดด้านคุณภาพ และข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ

วิธีการ

- เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่กำหนด

การรายงานผล

- เมื่อได้ผลลบ รายงานผล “Negative”
- เมื่อได้ผลบวก รายงานผล “Positive”

การแปลผล

Negative : ไม่มี Hb E

Positive : อาจเป็นผู้ที่มี Hb E ซึ่งพบได้ทั้งที่เป็นพาหะ Hb E, Hb E homozygote หรือ α -tha-

lassemia และหรือ β -thalassemia ที่มี Hb E ร่วมด้วย ต้องส่งตัวอย่างเลือดตรวจ Hb typing ต่อไป

ข้อจำกัดของการทดสอบ

- Hb H ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินที่ไม่เสถียร ถ้ามีปริมาณมากจะถูกออกซิไดซ์ตกตะกอนเกิดผลบวกได้
- ไม่ควรใช้กับ heparinized blood เนื่องจาก heparin รบกวนการตรวจวัด และก่อให้เกิดผลบวกปลอมได้

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำยาก่อนนำมาใช้ในงานบริการ โดยทำการทดสอบกับเลือดควบคุมคุณภาพ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกตัวอย่างเลือดควบคุมคุณภาพจากเลือดผู้ใหญ่ในงานประจำวัน ดังนี้

ตัวอย่างควบคุมผลลบ (Negative control)

เป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดของ Hb เป็น A_2A

ตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control)

เป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดของ Hb เป็น EA

ไม่ควรใช้ EE เพราะให้ผลบวกแรงเกินไป

ห้องปฏิบัติการสามารถเก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าวไว้ในตู้เย็น 4°C สำหรับใช้เป็นเลือดควบคุมคุณภาพต่อไปได้ 1 สัปดาห์

ในกรณีที่ไม่สามารถหาตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้ ผู้ปฏิบัติสามารถใช้อตัวอย่างเลือดที่เหลือ

จากการตรวจคัดกรองที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก และลบอย่างละ 1-2 ราย เก็บไว้ในตู้เย็น 2-8°C เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบครั้งต่อไป และเก็บเลือดใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดสอบไปเรื่อยๆ

2. ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบควรเป็นเลือดที่เจาะใหม่ในวันนั้น หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันที ควรเก็บเลือดไว้ในตู้เย็น 4°C และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ แต่ถ้าไม่มีตู้เย็นเก็บควรทำการทดสอบภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากเลือดที่เก่าฮีโมโกลบินบางส่วนจะถูกออกซิไดซ์ไปแล้ว สังเกตได้จากเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงคล้ำไม่ใช่แดงสดเหมือนเลือดเจาะใหม่ เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ DCIP จะตกตะกอนได้ง่ายขึ้นจนเกิดผลบวกปลอมได้

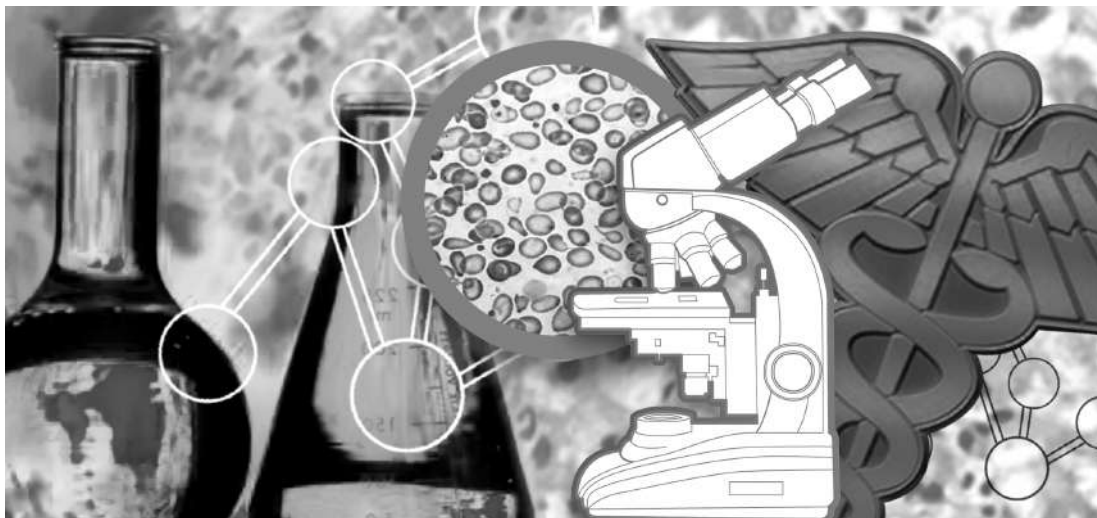
3. อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยาจะต้องเท่ากับ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และเวลาที่ให้ทำปฏิกิริยาจะต้องตรงตามที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา ดังนั้นอ่างน้ำหรือบล็อกควบคุมอุณหภูมิ (heat block) จะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของอุณหภูมิเป็นประจำ เพราะถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 36°C จะให้ผลลบปลอม แต่ถ้ามากกว่า 38°C ก็จะทำให้ผลบวกปลอมได้

หากทำการทดสอบแล้ว มีผลลบหรือบวกทุกตัวอย่าง ให้ตรวจสอบเรื่องอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยาเป็นอันดับแรก สำหรับประเด็นในเรื่องเวลาทำปฏิกิริยา จะพบความผิดพลาดได้มากกว่า ถ้าผู้ปฏิบัติทำการทดสอบครั้งละหลายตัวอย่าง (เช่นมากกว่า 10 ตัวอย่างต่อครั้ง) โดยเฉพาะถ้าทำการทดสอบในห้องที่ไม่ได้ปรับอากาศ และมีอุณหภูมิห้องสูงกว่า 30°C ตัวอย่างรายแรกๆ ที่เติมเลือดลงไปในน้ำยา ระหว่างที่รอเติมตัวอย่างเลือดรายต่อๆ ไป จนครบรายสุดท้ายได้เกิดปฏิกิริยาไปบางส่วนแล้ว เมื่อนำไปอุ่นต่ออีก 15 นาที อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

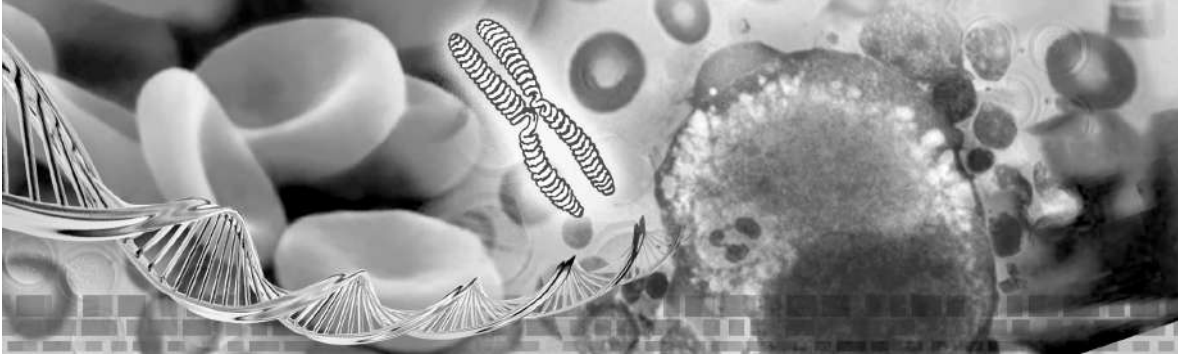
4. การควบคุมคุณภาพการอ่านผลทำเช่นเดียวกับการอ่านผล OF

ข้อควรระวัง

น้ำยา DCIP เป็นน้ำยาสีน้ำเงินเข้ม มีความไวต่อแสง อากาศ และอุณหภูมิที่สูงจึงต้องเก็บน้ำยาในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท บรรจุในกล่องเพื่อไม่ให้โดนแสง เก็บในตู้เย็น 4°C



การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย ด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง



ในการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (red blood cell indices) ค่าที่นิยมใช้ในการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย คือ ค่า MCV และ MCH โดยเม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็นธาลัสซีเมีย จะมีค่า MCV และ MCH ต่ำกว่าเม็ดเลือดแดงคนปกติ โดยใช้ตามเกณฑ์ของ Weatherall DJ และ Clegg JB คือ $MCV < 80 \text{ fL}$ และ/หรือ $MCH < 27 \text{ pg}$ ซึ่งมีความไวสูงพอในการคัดกรองพาหะ α -thalassemia1 และ β -thalassemia

วิธีการและการรายงานผล

รายงานค่าตามที่วิเคราะห์ให้ได้

การแปลผล

$MCV < 80 \text{ fL}$ และ/หรือ $MCH < 27 \text{ pg}$:
อาจเป็น α -thalassemia และ/หรือ β -thalassemia และหรือ Hb E โดย α -thalassemia มีโอกาสเป็นได้ทั้งชนิด α -thalassemia 1 และ α -thalassemia 2 ส่วน β -thalassemia ก็มีโอกาสเป็นได้ทั้ง β^0 -thalassemia และ β^+ -thalassemia

$MCV \geq 80 \text{ fL}$ และ $MCH \geq 27 \text{ pg}$: ไม่เป็นธาลัสซีเมีย หรืออาจเป็นธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรง เช่น α -thalassemia 2, Hb Constant Spring, Hb Paksè หรืออาจมี Hb E

ข้อจำกัดของการทดสอบ

1. การคัดกรองด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง จำเป็นต้องทำการทดสอบกับเม็ดเลือดที่เจาะใหม่หรือที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น 4°C ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่มีชีวิต มีการใช้พลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อคงสภาพเซลล์ไว้ตลอดเวลา เมื่อพลังงานลดลงเซลล์เม็ดเลือดแดงก็จะเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และแตกในที่สุด

2. ประมาณร้อยละ 20-40 ของพาหะ Hb E มีค่า MCV และ MCH มากกว่า 80 fL และ 27 pg ตามลำดับ จึงจำเป็นต้องตรวจด้วยวิธี DCIP ร่วมด้วย

การควบคุมคุณภาพ

ห้องปฏิบัติการต้องมีแนวทางการปฏิบัติงานเพื่อคงมาตรฐานเครื่องมือตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด รวมทั้งมีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control) ด้วยวัสดุควบคุมคุณภาพที่ได้มาตรฐาน และเข้าร่วมเป็นสมาชิก external quality assurance หรือ proficiency testing program และมีการบำรุงรักษาเครื่องมือเป็นประจำสม่ำเสมอ

**การตรวจวิเคราะห์ชนิด
และปริมาณฮีโมโกลบิน
(Hb typing & quantitation)**

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing & quantitation)

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ นิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ อาทิเช่น ความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงาน เครื่องสามารถตรวจได้ทั้งชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินได้อย่างต่อเนื่องในขั้นตอนเดียวกัน จึงไม่ยุ่งยากและไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูง อีกทั้งยังมีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ปัจจุบันเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่มีใช้ในประเทศไทยมี 2 หลักการ คือ

1. หลักการโครมาโตกราฟีอัดแรงดัน มีทั้งประเภทแรงดันสูง (high pressure liquid chromatography : HPLC) และแรงดันต่ำ (low pressure liquid chromatography : LPLC) โดยมีหลักการเดียวกัน คือ เป็นคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดบวก (cation exchange column chromatography) ส่วนคอลัมน์บรรจุอนุภาคขนาดเล็ก (spherical silica gel) เคลือบด้วยสารคาร์บอกซิล (carboxyl) ซึ่งมีประจุลบ ทำหน้าที่เป็น stationary phase จับกับประจุบวกของฮีโมโกลบินที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ทางระบบส่งสารตัวอย่าง (sample injector) จากนั้นฮีโมโกลบิน แต่ละชนิดจะถูกชะล้าง (elute) ออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ (mobile phase) ที่มีความแรงของประจุ (ionic strength) สูงกว่าความแรงของประจุของฮีโมโกลบินที่จับอยู่กับ stationary phase แต่เนื่องจากในตัวอย่างไม่ถึงชนิดฮีโมโกลบินปนกันหลายชนิด แต่ละชนิดมี ionic strength ไม่เท่ากัน เครื่องอัตโนมัติเหล่านี้จึงต้องมีโปรแกรมควบคุมการผสมบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่มี ionic strength ต่างกัน เพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงของ ionic

strength ที่เหมาะสมสำหรับฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ระยะเวลาที่ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดคงอยู่ในคอลัมน์ เรียกว่า retention time (RT) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละฮีโมโกลบิน จากนั้นฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกมาจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer detector) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม แล้วส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผล เพื่อวิเคราะห์ฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ อ้างอิงตาม RT ของฮีโมโกลบินมาตรฐาน และรายงานผลเป็น 2 ลักษณะ คือ รายงานโครมาโตแกรม แสดงการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ถูกชะล้างผ่านคอลัมน์ออกมาในเวลาต่าง ๆ (หรือนิยมเรียกกันว่า peak) และรายงานปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดตามพื้นที่ใต้กราฟในช่วงเวลาที่กำหนด

2. หลักการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (capillary electrophoresis) อาศัยการแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูง (10,000-30,000 volts) ผ่านตัวกลาง คือหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็กมาก (silica capillary) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-100 ไมโครเมตร (high voltage capillary electrophoresis) โดยปลายทั้งสองข้างของหลอดแก้วจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง (alkali buffer pH 9.4) เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้า เข้าไปจะเกิดการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่มีประจุสุทธิแตกต่างกันไปตามแรงขับเคลื่อนไฟฟ้า (electro osmotic flow) โดยตัวอย่างจะถูกปล่อยเข้าไปในหลอดแก้วทางด้านหัวบวก เคลื่อนที่ไปยังหัวลบผ่านเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (detector) และระบบแปลงสัญญาณ แล้วรายงานผลออกมา เรียกว่า electrophore-



gram (เทียบได้กับ chromatogram จากเครื่อง HPLC หรือ LPLC) โดยก่อนการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือดจะมีการปรับมาตรฐานตำแหน่งของฮีโมโกลบินให้ Hb A อยู่ตรงกลางของหน้าต่าง electrophoregram จากตัวอย่างควบคุมคุณภาพก่อน โดยฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่มีในตัวอย่างเลือดจะถูกกำหนดเป็นโซนเรียกว่า โซน 1- โซน 15 ใน electrophoregram ที่ปรากฏโดยอ้างอิงจาก Hb A และหรือ Hb A₂ ของตัวอย่างนั้น ในกรณีที่ตัวอย่างเลือดที่ตรวจวิเคราะห์ไม่มี Hb A และหรือ Hb A₂ เครื่องจะอ้างอิงชนิดฮีโมโกลบินจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ก่อนหน้านี้ และจะไม่ปรากฏแถบโซนใน electrophoregram

วัสดุอุปกรณ์ นำยา และวิธีการ

เครื่องมือของแต่ละบริษัทมีรายละเอียดแตกต่างกันออกไป ผู้ปฏิบัติควรได้รับการฝึกอบรมทั้งในด้านการเตรียมตัวอย่างเลือด การใช้และบำรุงรักษาเครื่องมือ ตลอดจนจนการอ่าน และการวิเคราะห์ผลจากผู้เชี่ยวชาญของบริษัท และผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาที่เกี่ยวข้องก่อนการให้บริการทางห้องปฏิบัติการ

การรายงานผล

เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ

ระบบคอลัมน์โครมาโตกราฟี (HPLC และ LPLC)

รายงานชนิดฮีโมโกลบินจาก โครมาโตแกรมที่ปรากฏออกมาจากส่วนแสดงผลพร้อมทั้งรายงานปริมาณ Hb A₂/E และ Hb F ที่เครื่องคำนวณให้โดยการรายงาน ชนิดฮีโมโกลบินที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ Hb Constant Spring, Hb A₂/E, Hb F, Hb A, Hb Bart's และ Hb H

เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ

หลักการ Capillary Electrophoresis

รายงานชนิดฮีโมโกลบินตามลักษณะ electrophoregram ที่ปรากฏและปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่เครื่องวิเคราะห์ให้เหมือนกับ การตรวจวิเคราะห์

ด้วยระบบอื่น ๆ แต่เนื่องจากเครื่อง high voltage capillary electrophoresis มีศักยภาพในการแยก Hb A₂ กับ Hb E ออกจากกันได้ ในขณะที่เครื่องอื่นที่อาศัยหลักการคอลัมน์โครมาโตกราฟี ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ค่าอ้างอิงของ Hb A₂ และ Hb E ในผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ ที่มี Hb E จึงแตกต่างจากเครื่องอื่น ๆ ซึ่งปริมาณ Hb E ที่วัดได้จะมีปริมาณ Hb A₂ รวมอยู่ด้วย หากต้องการใช้ค่าอ้างอิงตามที่ยอมรับกันในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งพหุ Hb E ที่สงสัยว่าจะมีแฝง α -thalassemia 1 ซึ่งใช้ค่า cut off ที่ Hb E < 25% สามารถทำได้โดยการรวมปริมาณ Hb A₂ กับ Hb E เข้าด้วยกันได้

การแปลผลการวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน

(Hb Typing) ที่พบบ่อยในประชากรไทย

1. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A₂A และปริมาณ Hb A₂ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.5% พบได้ในหลายกรณี ดังนี้

1.1 คนปกติที่ไม่เป็นธาลัสซีเมีย หรืออาจเป็นธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรง กลุ่มนี้ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาพบว่า MCV, MCH และ Blood Smear ปกติ

1.2 ผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 2 และผู้ที่เป็น homozygous α -thalassemia 2 กลุ่มนี้โดยทั่วไปจะไม่มีอาการซีด Hb มากกว่า 10 g/dL ค่า MCV มีค่าตั้งแต่ 70 fL จนถึงมากกว่า 80 fL

1.3 ผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 กลุ่มนี้โดยทั่วไปจะไม่มีอาการซีด Hb มากกว่า 10 g/dL (ถ้าไม่มีภาวะอื่นแทรกซ้อน) blood smear พบเม็ดเลือดแดงผิดปกติเล็กน้อย และส่วนใหญ่มีค่า MCV น้อยกว่า 80 fL และ MCH น้อยกว่า 27 pg

เนื่องจากผลการตรวจ Hb typing ไม่สามารถแยกผู้ที่เป็นพาหะ α -thalassemia 1 พาหะ α -thalassemia 2 และ homozygous α -thalassemia 2 ออกจากคนปกติที่ไม่เป็นธาลัสซีเมียหรือผู้ที่เป็น

ธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรงได้ หากผลการตรวจพบ Hb typing A₂A โดย Hb A₂ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.5% ห้องปฏิบัติการสามารถแปลผลเป็น normal Hb typing, not rule out α -thalassemia

2. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A₂A และปริมาณ Hb A₂ >3.5% แปลผล เป็น β -thalassemia trait with or without α -thalassemia ส่วนใหญ่มีปริมาณ Hb A₂ ประมาณ 3.6-8% MCV ประมาณ 60-75 fL ผลการตรวจ blood smear พบเม็ดเลือดแดงผิดปกติเล็กน้อย หากทำการตรวจคัดกรองด้วย OF และ DCIP จะให้ผลบวกกับการทดสอบ OF test แต่ให้ผลลบกับการทดสอบ DCIP

หมายเหตุ

- ในพาหะ β -thalassemia ที่มี α -thalassemia 1 ร่วมด้วย (double heterozygote) ปริมาณ Hb A₂ อาจต่ำกว่า 4% และค่า MCV อาจจะสูงขึ้น เป็น 78-80 fL

- ในบางภูมิภาค β^+ -thalassemia บางชนิด อาจมีค่า MCV เล็กและมีปริมาณ Hb A₂ อยู่ในช่วง 3.5-4% ได้

3. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EA และปริมาณ Hb E 25-35% แปลผลเป็น Hb E trait โดยทั่วไปผู้ที่ เป็นพาหะ Hb E จะมีค่า MCV ประมาณ 75-85 fL หากทำการตรวจคัดกรองด้วย OF สามารถให้ผลได้ทั้งบวกและลบ แต่ผลการตรวจคัดกรองด้วย DCIP จะให้ผลบวก

4. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EA และปริมาณ Hb E < 25% แปลผลเป็น Hb E trait with or without α -thalassemia โดยทั่วไปผู้ที่ เป็นพาหะ Hb E ร่วมกับพาหะ α -thalassemia 1 พบ Hb E ประมาณ 19-21% MCV ประมาณ 60-75 fL ผลการตรวจคัดกรองด้วย OF และ DCIP เป็นบวกทั้งคู่

5. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EE โดยมีปริมาณ Hb E \geq 80% และ Hb F \leq 5% แปลผลเป็น homozygous Hb E with or without α -thalassemia เนื่องจากผู้ที่ เป็น homozygous Hb E ทั้งที่มีและไม่มียีนแฝง α -thalassemia ร่วม มีผลการตรวจ Hb typing ที่คล้ายคลึงกัน ต้องตรวจวิเคราะห์ DNA เท่านั้นจึงจะให้การวินิจฉัยการมียีนแฝง α -thalassemia ได้ โดยทั่วไป homozygous Hb E มีค่า Hb มากกว่า 10 g/dL MCV ประมาณ 60-70 fL ผลการตรวจ blood smear พบเม็ดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและรูปร่าง พบ target cell จำนวนมาก หากทำการตรวจคัดกรองด้วย DCIP จะให้ผลบวก

6. ในกรณีที่ไม่แน่ใจว่าผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EE หรือ EF เนื่องจากปริมาณ Hb F เพิ่มขึ้นจากที่ระบุในข้อ 5 ทำให้สับสนในการรายงานผลว่าเป็น EE หรือ EF ดังนั้นจึงอาจรายงานเป็น EE/ EF และแปลผลเป็น “suspected homozygous Hb E or β -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia กรุณาดู clinical หรือทำ family study ประกอบการแปลผล” เนื่องจากความผิดปกติ 2 ชนิดนี้มีจีโนไทป์ที่ต่างกัน และมีความรุนแรงต่างกัน การวินิจฉัยแยกชนิดต้องพิจารณาผลการตรวจอื่น ๆ ประกอบด้วย หากเป็น EE คือ homozygous Hb E จะไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรง ดังรายละเอียดในข้อ 5 แต่ถ้าเป็น EF ก็จะเป็นโรค β -thalassemia/ Hb E ซึ่งผลการตรวจทางโลหิตวิทยาจะพบความรุนแรงมากกว่า ดังรายละเอียดในข้อ 12

7. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A₂A แปลผลเป็น suspected Hb Constant Spring อย่างไรก็ตามฮีโมโกลบินผิดปกตินี้ อาจเป็น Hb Pakse' ได้ เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิดนี้มีจำนวนกรดอะมิโนของสาย α -globin มากกว่าปกติ 31 ตัวเท่ากัน และถึงแม้จะมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 142 ต่างกัน โดยที่ Hb Constant Spring เป็นกลูตามีน (Glutamine: Glu) ส่วน Hb Pakse' เป็นไทโรซีน (Tyrosine: Tyr) แต่ประจุสุทธิไม่ต่างกัน จึงตรวจพบในตำแหน่งเดียวกันทั้งการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า และการตรวจ



ด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ HPLC หรือ LPLC แต่จะรายงานผลจากการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเป็น Hb Constant Spring เนื่องจาก Hb Constant Spring มีความซุกในการตรวจพบมากกว่า Hb Pakse' โดยทั่วไปผู้ที่ เป็นพาหะจะไม่ซีด และมี ข้อมูลทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติ

8. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A₂A Bart's แปลผลเป็น suspected homozygous Hb Constant Spring ซึ่งผู้ป่วยมักมีภาวะซีดคล้าย ผู้ที่เป็นโรค Hb H อย่างไรก็ตามอาจตรวจไม่พบ Hb Bart's ได้ เนื่องจากสาย γ -globin มีปริมาณน้อย

9. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A₂A H หรือ A₂A Bart's H ปริมาณ Hb A₂ ค่อนข้างต่ำกว่าปกติ แปลผลเป็น Hb H disease (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2) เนื่องจากการตรวจพบ Hb H (β_4) หรือ Hb Bart's (γ_4) แสดงว่าสาย α -globin จะต้องมียปริมาณน้อยลงมาก จึงทำให้สาย β -globin และสาย γ -globin เหลืออยู่ มาก จึงจับกันเอง 4 สาย กลายเป็น Hb H และ Hb Bart's ในผู้ป่วยบางรายอาจไม่พบ Hb Bart's เนื่องจากสาย γ -globin มีปริมาณน้อย ผลการตรวจ blood smear ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ พบลักษณะเม็ดเลือดแดงแบบ ธาลัสซีเมีย แต่มีลักษณะผิดปกติประมาณ 1+ ถึง 2+ ลักษณะจำเพาะที่ใช้วินิจฉัยโรค Hb H ได้ดี คือการตรวจพบเม็ดเลือดแดงที่มี inclusion body โดยอาจตรวจพบเม็ดเลือดแดงเช่นนี้ได้ถึง 30-90% ของเม็ดเลือดแดงทั้งหมด

10. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A₂A H หรือ CS A₂A Bart's H แปลผล เป็น Hb H-CS disease (α -thalassemia 1/ Hb CS หรือ α -thalassemia 1/ Hb Pakse') อาการต่าง ๆ จะคล้ายผู้ที่เป็นโรค Hb H disease (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2) ในข้อที่ 9 แต่อาการมักจะรุนแรงกว่า เนื่องจากมีความไม่เสถียร ของ Hb H ร่วมกับ Hb CS หรือ Hb Pakse' และ ข้อควรระวังสำหรับห้องปฏิบัติการคือ ความไม่เสถียร ร่วมกับมีปริมาณน้อยของ Hb H และ Hb CS หรือ

Hb Pakse' หากเก็บเลือดไว้นานเกินไปอาจตรวจไม่ พบ ทำให้การแปลผลผิดพลาดได้

11. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A₂F ในเด็กอายุมากกว่า 1 ปี ร่วมกับการมี อาการของโรคธาลัสซีเมียชัดเจน ซีด ตับม้ามโต แปลผลเป็น homozygous β^0 -thalassemia with or without α -thalassemia จากการที่ตรวจไม่พบ Hb A แสดงว่าผู้ป่วยสังเคราะห์สาย β -globin ไม่ได้เลย จึงมีการสังเคราะห์สาย γ -globin ขึ้นมาทดแทน ทำให้ตรวจพบ Hb F มีปริมาณสูงมาก ส่วนปริมาณ Hb A₂ อาจสูงขึ้นเล็กน้อยหรืออยู่ในเกณฑ์ปกติ ผลการตรวจ blood smear พบเม็ดเลือดแดงมีลักษณะ ผิดปกติมากกว่าในโรค Hb H ไม่พบ Hb H inclusion body ในเม็ดเลือดแดง แต่ผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วอาจ จะพบตะกอนของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงได้

ข้อควรระวังหากพบผลการวิเคราะห์ ฮีโมโกลบินเป็น A₂F คือ ต้องตรวจสอบอายุ ของผู้ป่วยให้ดี ถ้าเป็นเด็กทารกที่อายุยังไม่ถึง 1 ปี จะไม่สามารถวินิจฉัยโรคในทันทีที่แน่นอนได้ เนื่องจากปริมาณ Hb F ยังคงสูงอยู่ ต้องรอให้ Hb F ค่อย ๆ ลดลงจนอายุมากกว่า 1 ปี จึงสามารถแปลผล การตรวจ Hb typing ได้

12. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EF โดยมีปริมาณ Hb E ประมาณ 40-80% Hb F ประมาณ 20-60% ไม่พบ Hb A พบได้ ในหลายกรณีดังนี้

12.1 กรณีที่เป็นผู้ป่วย β^0 -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia ผู้ป่วยมีอาการ ของโรคธาลัสซีเมียชัดเจน ซีด ตับม้ามโต คล้าย homozygous β^0 -thalassemia หรืออาจน้อยกว่า โดยทั่วไปผู้ป่วยกลุ่มนี้มีปริมาณ Hb 4-10 g/dL MCV ประมาณ 55-75 fL ผลการตรวจ blood smear พบเม็ดเลือดแดงที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและ รูปร่าง อาจพบเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (nucleated red cell) ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการ ให้เลือดมาแล้ว อาจพบ Hb A จาก donor blood ทำให้ปริมาณ Hb E และ Hb F เปลี่ยนแปลงไป

ถ้าไม่ทราบประวัติการรับเลือดมาก่อน จะทำให้การวินิจฉัยผิดพลาดได้

12.2 กรณีที่ผู้ป่วยมี deletional HPFH ร่วมกับ Hb E โดยทั่วไปผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่ซีด มีปริมาณ Hb > 10 g/dL ผลการตรวจ blood smear พบลักษณะเม็ดเลือดแดงค่อนข้างปกติ รายงานผลเป็น suspected HPFH/ Hb E

เนื่องจากผลการตรวจ Hb typing ไม่สามารถแยกผู้ที่เป็น β^0 -thalassemia/ Hb E และ HPFH/ Hb E ออกจากกันได้ หากผลการตรวจพบ Hb typing EF โดยมีปริมาณ Hb E ประมาณ 40-80% Hb F ประมาณ 20-60% ไม่พบ Hb A ห้องปฏิบัติการสามารถแปลผลเป็น suspected β^0 -thalassemia/ Hb E or HPFH/ Hb E with or without α -thalassemia

13. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A_2FA โดยปริมาณ Hb F 10-30% พบได้ในหลายกรณี ดังนี้

13.1 ในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะซีดไม่มีประวัติการรับเลือดภายใน 3 เดือน ก่อนทำการตรวจเลือด ควรแปลผลเป็น suspected β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia หรือ β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia

13.2 ถ้าไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมียเลยก็อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างเลือดรายนั้นเป็นพาหะ HPFH หรือพาหะ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia ซึ่งเป็นภาวะที่ยีน γ -globin สร้างสาย γ -globin ได้ในปริมาณสูงโดยไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ควรแปลผลเป็น suspected HPFH trait or $(\delta\beta)^0$ -thalassemia trait

เนื่องจากผลการตรวจ Hb typing ไม่สามารถแยกผู้ที่เป็น β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia, β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia, พาหะ HPFH และ พาหะ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia ออกจากกันได้ หากผลการตรวจพบ Hb typing A_2FA โดยปริมาณ Hb F 10-30% ห้องปฏิบัติการสามารถแปลผลเป็น suspected β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia or β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia or HPFH trait or $(\delta\beta)^0$ -thalassemia trait with or without α -thalassemia อย่างไรก็ตามการตรวจพบ Hb F ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย ก่อนที่จะทำการวินิจฉัยใดๆ ต้องตรวจสอบอายุของผู้ป่วยก่อนเสมอ หากอายุยังไม่ครบ 1 ปี จะยังไม่สามารถให้การวินิจฉัยที่ถูกต้องได้ นอกจากนั้นควรพิจารณาอาการทางคลินิกประกอบ หากไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมียเลย ก็อาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยมีภาวะ HPFH

ตารางแสดงตัวอย่างจีโนไทป์ของโรคธาลัสซีเมียที่มีฟีโนไทป์ซับซ้อน

Hb Type	การแปลผล	ความหมาย (genotype)
EA Bart's	EA Bart's Disease	Hb H disease with Hb E trait (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2 - β^E/β^A)
EE Bart's, EF Bart's	EF Bart's Disease	Hb H disease with β^0 -thalassemia/ Hb E or Hb H disease with homozygous Hb E (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2 - β^0/β^E or β^E/β^E)
EFA Bart's	EFA Bart's Disease	Hb H disease with β^+ -thalassemia/ Hb E (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2 - β^+/β^E)
CS EA Bart's	CS EA Bart's Disease	Hb H-CS with Hb E trait (α -thalassemia 1/ α^{CS} - β^E/β^A)
CS EE Bart's, CS EF Bart's	CS EF Bart's Disease	Hb H-CS with β^0 -thalassemia/ Hb E or Hb H-CS disease with homozygous Hb E (α -thalassemia 1/ α^{CS} - β^0/β^E or β^E/β^E)
CS EFA Bart's	CS EFA Bart's Disease	Hb H-CS with β^+ -thalassemia/ Hb E (α -thalassemia 1/ α^{CS} - β^+/β^E)



หรือ ($\delta\beta$)⁰-thalassemia หรือภาวะที่มี stress erythropoiesis จากสาเหตุอื่น ๆ ที่ทำให้มีภาวะเลือดจาง เช่น การตั้งครรภ์ ภาวะเลือดจางเรื้อรัง มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่การเพิ่มขึ้นของปริมาณ Hb F ในภาวะที่มี stress erythropoiesis นี้มักจะเพิ่มขึ้นไม่เกินร้อยละ 10 ดังนั้นการที่ตรวจพบปริมาณ Hb F สูงขึ้น แล้วจะสรุปว่าเป็นโรค β -thalassemia จึงต้องพิจารณาให้รอบคอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องทราบประวัติ และอาการของคนไข้ หากมีผลการตรวจเลือดของครอบครัวประกอบด้วยจะช่วยให้นักวินิจฉัยได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

14. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EFA ผู้ป่วยมีภาวะซีดไม่มีประวัติการรับเลือดภายใน 3 เดือนก่อนทำการตรวจเลือด ควรแปลผลเป็น β^+ -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia

15. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EA Bart's, EE Bart's, EFA Bart's, EF Bart's, CS EA Bart's, CS EE Bart's, CS EFA Bart's และ CS EF Bart's ทั้งหมดนี้เป็นกลุ่มโรคธาลัสซีเมียที่มีฟีโนไทป์และจีโนไทป์ซับซ้อน ซึ่งมีภาวะร่วมระหว่าง α -thalassemia, β -thalassemia และ Hb E ภาวะเหล่านี้เกิดเนื่องจากสาย α -globin มีปริมาณน้อยลง และสาย α -globin ซบจับกับสาย β -globin ปกติมากกว่าสาย β^E -globin ในกรณีที่เป็ Hb E trait จึงตรวจพบปริมาณของ Hb E ลดลงด้วยเสมอเมื่อเทียบกับปริมาณ Hb A โดยจะพบปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 20 แต่การจะสรุปจีโนไทป์ให้ถูกต้องจริง ๆ ควรจะต้องทำการตรวจวิเคราะห์ DNA ทั้งยีน α -thalassemia และ β -thalassemia ด้วยจึงจะสามารถสรุปเพื่อให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ของครอบครัวผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง

16. ในกรณีที่พบฮีโมโกลบินผิดปกติที่นอกเหนือจาก Hb E และ Hb CS จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อย (rare abnormal Hb) เช่น Hb J Bangkok, Hb Hope, Hb Q-Thailand, Hb C, Hb O

และอื่น ๆ ควรรายงานตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบนโครมาโตแกรมหรือ electrophoregram และแปลผลเป็น suspected abnormal Hb ไม่ควรระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ ถึงแม้ว่าเครื่องจะรายงาน Window ของฮีโมโกลบินเหล่านั้นก็ตาม เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติหลายชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากกัน โดยการตรวจ Hb typing ไม่ว่าจะโดยเครื่อง HPLC, LPLC หรือ CE เช่น การพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่ S window ในระบบคอลัมน์โครมาโตกราฟี เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ DNA พบว่าเป็นได้ทั้ง Hb Tak, Hb D Punjab, Hb Queens, Hb Siam และ Hb S หากต้องการทราบชนิดของความผิดปกติจะต้องตรวจยืนยันโดยการตรวจวิเคราะห์ DNA หรือตรวจหาลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่อไป

ที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นแนวทางในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยซึ่งต้องอาศัยข้อมูลหลายอย่างประกอบ ตั้งแต่ผลการตรวจคัดกรองค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ผล Hb typing ปริมาณ Hb A₂ ปริมาณ Hb F นอกจากนี้ประวัติผู้ป่วยและครอบครัว ตลอดจนผลการตรวจเลือดของครอบครัวก็มีส่วนช่วยให้การวินิจฉัยมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

ข้อจำกัด

1. เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติแสดงผลในลักษณะโครมาโตแกรมหรือโซนต่าง ๆ ที่ปรากฏร่วมกับปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด โดยไม่ได้สรุปผล Hb typing ให้ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องมีความรู้และประสบการณ์สูงในการรายงานผลและแปลผล

2. อนุพันธ์ของฮีโมโกลบิน (hemoglobin derivatives) เช่น glycosylated Hb, acetylated Hb F และฮีโมโกลบินที่โมเลกุลสลายบางส่วน

(degradation) เนื่องจากเลือดเก่าอาจทำให้เกิดปัญหา การเคลื่อนของค่า retention time และสับสนในการ อ่านผลได้

3. ในกรณีที่พบปริมาณ Hb F สูงกว่าปกติ ถ้าไม่ใช่เลือดเด็กแรกเกิด ควรย้อม F Cell ประกอบ การรายงานผลด้วย เนื่องจากมี abnormal Hb บางชนิด ปรากฏในตำแหน่งเดียวกับ Hb F

4. ในกรณีที่ไม่แน่ใจว่าเป็น Hb H หรือไม่ การย้อม Hb H inclusion bodies จะช่วยยืนยันการ รายงานผลได้

5. ในกรณีที่สงสัยว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติ การตรวจเลือดบุคคลอื่น ๆ ในครอบครัว และการ ตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยระบบอื่นด้วยอาจจะ ช่วยยืนยันผลในเบื้องต้นได้ว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติ หรือไม่ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถรายงานชนิดของ ฮีโมโกลบินผิดปกติได้ จนกว่าจะได้ตรวจวิเคราะห์ DNA หรือลำดับกรดอะมิโน

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ

1. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษา และสอบเทียบครุภัณฑ์เป็นประจำสม่ำเสมอ

2. ควรมีการควบคุมคุณภาพภายในห้อง ปฏิบัติการ (internal quality control) โดยใช้วัสดุ ควบคุมคุณภาพที่มีมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการ วิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ

3. ควรเข้าร่วมกิจกรรมควบคุมคุณภาพโดย หน่วยงานภายนอก (external quality assurance หรือ proficiency testing program) เป็นประจำ

4. การรายงานผลแต่ละตัวอย่างควร ตรวจสอบความสัมพันธ์กับผลการตรวจคัดกรอง เบื้องต้นที่มีด้วยเสมอ

5. ผู้ปฏิบัติงานควรได้รับการฝึกอบรม และตรวจประเมินประสิทธิภาพด้านองค์ความรู้ใน การวิเคราะห์และประมวลผลการตรวจทางห้อง ปฏิบัติการเป็นประจำ

ตารางสรุปการแปลผลการตรวจ Hb typing

ลำดับ	ผลการตรวจ Hb typing	การแปลผล	ผลการตรวจคัดกรอง				ชนิดของธาลัสซีเมีย
			OF	DCIP	MCV (fL)	MCH (pg)	
1.	A ₂ A, Hb A ₂ ≤ 3.5%	Normal or non clinically significant thalassemia	negative	negative	≥ 80	≥ 27	พาหะ α-thalassemia 2
2.	A ₂ A, Hb A ₂ ≤ 3.5%	Normal Hb typing, not rule out α-thalassemia	positive	negative	< 80	< 27	พาหะ α-thalassemia 1 พาหะ α-thalassemia 2 หรือ homozygous α-thalassemia 2
3.	A ₂ A, Hb A ₂ 3.6-8%	β-thalassemia trait with or without α-thalassemia	positive	negative	< 80	< 27	β-thalassemia trait with or without α-thalassemia
4.	EA, Hb E ≥ 25%	Hb E trait	negative or positive	positive	< 80 or normal	< 27 or normal	Hb E trait
5.	EA, Hb E < 25%	Hb E trait with or without α-thalassemia	positive	positive	< 80	< 27	Hb E trait with or without α-thalassemia
6.	EE, Hb E ≥ 80%, Hb F ≤ 5%	homozygous Hb E with or without α-thalassemia	positive	positive	< 80	< 27	homozygous Hb E with or without α-thalassemia
7.	EE/ EF, E > 75% Hb F > 5% กรณีไม่แน่ใจว่า EE หรือ EF เนื่องจาก Hb F สูง	suspected homozygous Hb E or β-thalassemia/ Hb E with or with out α-thalassemia กรุณาดูอาการทางคลินิก หรือทำ Family Study ประกอบการแปลผล	positive	positive	< 80	< 27	suspected homozygous Hb E ไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
							suspected β-thalassemia/ Hb E มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย



ลำดับ	ผลการตรวจ Hb typing	การแปลผล	ผลการตรวจคัดกรอง				ชนิดของธาลัสซีเมีย
			OF	DCIP	MCV(fL)	MCH(pg)	
8.	CS A ₂ A	suspected Hb Constant Spring	negative or positive	negative	< 80 or normal	< 27 or normal	Hb Constant Spring trait
9.	CS A ₂ A Bart's	suspected homozygous Hb Constant Spring	positive	negative	< 80	< 27	homozygous Hb Constant Spring
10.	A ₂ A H หรือ A ₂ A Bart's H	Hb H disease (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2)	positive	negative or positive	< 80	< 27	Hb H disease (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2)
11.	CS A ₂ A H หรือ CS A ₂ A Bart's H	Hb H-CS disease (α -thalassemia 1/ Hb Constant Spring)	positive	negative or positive	< 80	< 27	Hb H-CS disease (α -thalassemia 1/ Hb Constant Spring)
12.	A ₂ F ผู้ป่วยอายุมากกว่า 1 ปี	Homozygous β^0 -thalassemia with or without α -thalassemia	positive	negative	< 80	< 27	homozygous β^0 -thalassemia with or without α -thalassemia
13.	EF, Hb E 40-80%, Hb F 20-60%	suspected β^0 -thalassemia/ Hb E or HPFH/ Hb E with or without α -thalassemia	positive	positive	< 80	< 27	suspected β^0 -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
							suspected HPFH/ Hb E with or without α -thalassemia ไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
14.	A ₂ FA, Hb F 10-30%	suspected β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia or β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia or HPFH trait or ($\delta\beta^0$)-thalassemia trait with or without α -thalassemia	positive	negative	< 80	< 27	suspected β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia or β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia with or without α -thalassemia มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
							suspected HPFH trait or ($\delta\beta^0$)-thalassemia trait with or without α -thalassemia ไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
15.	EFA	β^+ -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia	positive	positive	< 80	< 27	β^+ -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia
16.	EA Bart's	EA Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	EA Bart's disease
17.	EE Bart's or EF Bart's	EF Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	EF Bart's disease
18.	EFA Bart's	EFA Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	EFA Bart's disease
19.	CS EA Bart's	CS EA Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	CS EA Bart's disease
20.	CS EE Bart's หรือ CS EF Bart's	CS EF Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	CS EF Bart's disease
21.	CS EFA Bart's	CS EFA Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	CS EFA Bart's disease
22.	rare abnormal Hb	suspected abnormal Hb	ขึ้นกับชนิดของ abnormal Hb ที่พบ				suspected abnormal Hb

**การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ
ของยีนที่เป็นสาเหตุของ
 α -thalassemia 1**

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ ของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ในประชากรไทยมีสาเหตุมาจากการขาดหายไปของยีน α -globin ทั้งสองยีนบนโครโมโซมเดียวกัน จึงไม่สามารถสังเคราะห์สาย α -globin ได้เลย สามิ-ภรรยาที่มีความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ทั้งคู่ มีโอกาสถ่ายทอดความผิดปกติร่วมกันไปสู่ลูกทำให้ลูกเป็น homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ ตายคลอด หรือไม่ก็ชั่วโมงหลังคลอด ในขณะที่มารดาจะเกิดภาวะแทรกซ้อนของการตั้งครรภ์ มีอาการครรภ์เป็นพิษ มีการคลอดผิดปกติ ตกเลือดหลังคลอด หากอาการรุนแรงมาก อาจเสียชีวิตได้ หากห้องปฏิบัติการมีศักยภาพในการตรวจหาความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้องและรวดเร็ว จะช่วยป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับมารดาที่ตั้งครรภ์บุตรเป็น Hb Bart's hydrops fetalis ได้อย่างทันทั่วทั้ง

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ที่มีรายงานในประชากรไทยมี 2 ชนิด คือชนิด SEA deletion และชนิด THAI deletion ส่วนใหญ่ที่พบเป็นชนิด SEA deletion ชนิด THAI deletion ถึงแม้จะพบในอัตราส่วนที่น้อยกว่า แต่ถ้าพบความผิดปกติร่วมกับชนิด SEA deletion ก็ส่งผลให้เกิด Hb Bart's hydrops fetalis ได้เช่นเดียวกัน

หลักการ

Gap PCR/ Agarose Gel Electrophoresis

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 สามารถตรวจหาได้โดยเทคนิค PCR ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธี Gap PCR ร่วมกับการวิเคราะห์

PCR Product โดยการทำ agarose gel electrophoresis อาศัยการสร้าง primer ให้ครอบคลุมบริเวณ DNA ที่ขาดหายไป เมื่อนำไปทำ PCR จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ได้ เนื่องจากการขาดหายไปของ DNA ทำให้ primer ดังกล่าวถูกเลื่อนเข้ามาใกล้กัน ส่วน DNA คนปกติ (normal DNA) primer ทั้งสองที่ใช้อยู่ห่างกันมากกว่า 17.5 kb (SEA deletion) และมากกว่า 38 kb (THAI deletion) ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่เกินกว่าจะเพิ่มจำนวนได้ ในการทำ PCR ทั่วๆ ไป จึงไม่มี PCR product เกิดขึ้น และเพื่อให้สามารถวินิจฉัยแยกแยะระหว่าง homozygous α -thalassemia 1 และพาหะ α -thalassemia 1 จึงมีการเพิ่ม primer สำหรับเพิ่มปริมาณ normal DNA ลงไปในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย จากนั้นจึงติดตามการเกิด PCR products โดยการทำ agarose gel electrophoresis และเปรียบเทียบขนาด DNA ที่เกิดขึ้นทำให้ทราบว่าบุคคลนั้นมีความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion หรือชนิด THAI deletion หรือไม่

Relative Quantitative PCR

เทคนิค Relative Quantitative PCR อาศัยการออกแบบ primer และ probe 3 ชุด สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ชนิด SEA deletion และชนิด THAI deletion เปรียบเทียบกับยีน α -globin ที่ปกติ โดย probe ทั้ง 3 ชนิด ได้รับการออกแบบให้ติดฉลากด้วยสี fluorescence ที่แตกต่างกันจึงสามารถติดตามความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ทั้ง 2 ชนิดได้

ตัวอย่างที่ไม่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ทั้งชนิด SEA และชนิดไทย จะพบเฉพาะ

การเรืองแสงของสี fluorescence ของ normal probe ส่วนตัวอย่างที่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 (SEA) heterozygote จะพบการเรืองแสงของสี fluorescence ของ normal probe และ SEA probe และ ตัวอย่างที่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 (THAI) heterozygote จะพบการเรืองแสงของสี fluorescence ของ normal probe และ THAI probe

วิธีการ

ส่วนใหญ่แต่ละหน่วยงานจะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ขึ้นใช้เอง หลักการวิเคราะห์จึงอาจแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณตัวอย่างส่งตรวจ ตลอดจนความพร้อมของบุคลากรและเครื่องมือ สิ่งที่สำคัญคือจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ก่อนเปิดบริการ เพื่อให้สอดคล้องตามข้อกำหนดในมาตรฐานสากล และมีความมั่นใจในประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์

การรายงานผลในกรณีตรวจวินิจฉัยในบุคคลทั่วไปที่ไม่ใช่การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดา

รายงาน Negative for α -thalassemia 1 (SEA and THAI deletions) ในกรณีที่ตรวจไม่พบความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ชนิด SEA และชนิด THAI

รายงาน Positive for α -thalassemia 1 (SEA deletion) ในกรณีที่ตรวจพบความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ชนิด SEA

รายงาน Positive for α -thalassemia 1 (THAI deletion) ในกรณีที่ตรวจพบความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ชนิด THAI

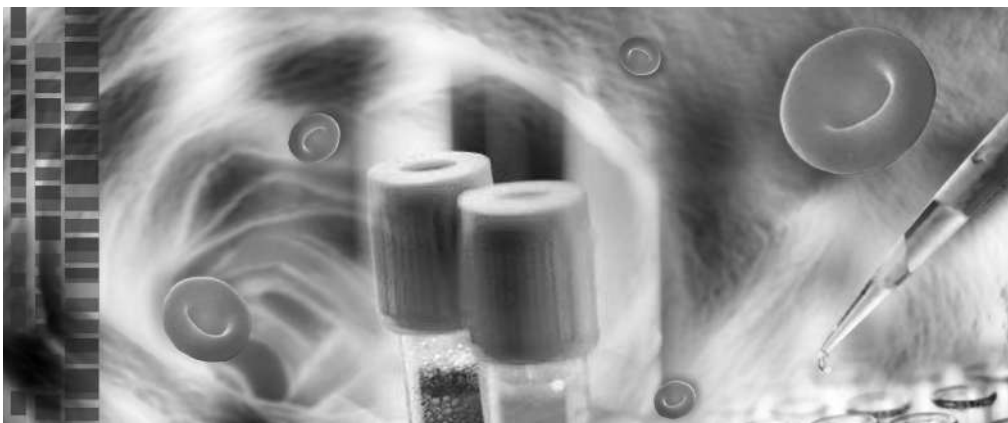
การควบคุมคุณภาพ

1. ควรมีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control) โดยใช้ตัวอย่าง DNA ควบคุมคุณภาพที่ผ่านการตรวจยืนยันแล้วให้ครบทั้ง 3 ชนิด คือ DNA ควบคุมคุณภาพชนิด SEA deletion, DNA ควบคุมคุณภาพชนิด THAI deletion และ DNA ควบคุมคุณภาพที่ไม่พบความผิดปกติของทั้ง SEA และ THAI deletion (negative control) ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ

2. ควรเข้าร่วมโครงการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับหน่วยงานอื่น

3. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษา และสอบเทียบครุภัณฑ์ที่มีผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ เช่น เครื่อง PCR ไปเบตอัดโนมิติ ตู้เย็น และตู้แช่สำหรับเก็บตัวอย่าง และน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

4. บุคลากรที่ปฏิบัติหน้าที่ควรได้รับการฝึกอบรมเป็นประจำอย่างต่อเนื่อง



**การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ
ของยีนที่เป็นสาเหตุของ
 β -thalassemia**

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ ของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในประชากรไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด point mutation ซึ่งเกิดจากการมีเบสเปลี่ยนแปลงไป (base substitution) หรือเบสจำนวนน้อย ๆ ขาดหายไป หรือเกินมา (small deletion หรือ insertion) ทำให้เกิด mutation ที่เรียกว่า frameshift mutation ความรุนแรงของ β -thalassemia ขึ้นกับชนิดของ mutation ที่เกิดขึ้นว่าสามารถสร้าง mRNA หรือสาย β -globin ได้หรือไม่ หากไม่สามารถสร้างสาย β -globin ได้เลย เรียก β^0 -thalassemia แต่ถ้าสามารถสร้างสาย β -globin ได้บ้าง เรียก β^+ -thalassemia ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในประชากรไทยมีความหลากหลายมาก ปัจจุบันมีรายงานมากกว่า 30 ชนิด โดยแต่ละภูมิภาคแต่ละชุมชนก็มีความแตกต่างกัน

การตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค allele specific PCR (ASPCR), เทคนิค reverse dot blot hybridization (RDB) และการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

หลักการ

เทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR)

เทคนิค allele specific PCR (ASPCR) อาศัยการออกแบบและสังเคราะห์ primer ให้มีความจำเพาะต่อ mutation ชนิดใดชนิดหนึ่ง ชนิดละ 2 primer, primer ที่ 1 จำเพาะต่อ Allele ปกติ และ primer ที่ 2 จำเพาะต่อ mutation ชนิดนั้น ๆ โดยออกแบบให้มีเบสจำเพาะที่ปลายด้าน 3' จากนั้นนำ primer ทั้งสองชนิดนี้ไปทำ PCR คู่กับ primer ปกติอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็น common primer โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase หรือ DNA

polymerase ชนิดที่ไม่มีฤทธิ์ของ 3'-5' exonuclease ภายใต้สภาวะในการทำ PCR ที่เหมาะสม primer จำเพาะแต่ละชนิด จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน β -globin gene จาก Allele ใด Allele หนึ่งที่จำเพาะเท่านั้น จึงสามารถแยก β -globin gene ปกติ และ β -thalassemia ออกจากกันได้โดยตรวจดูชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

ในการทำ ASPCR ตัวอย่างที่ให้ผลลบ จะไม่ปรากฏแถบ DNA ใดๆ ให้เห็นบนแผ่นเจลที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้า ดังนั้นนอกเหนือจากตัวอย่างควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และให้ผลลบ (negative control) แล้ว จะต้องมีการควบคุมคุณภาพปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลอง (internal control) ของการทำ PCR ด้วย โดยเป็นการเพิ่มจำนวนของยีนอื่นที่ไม่ใช่ β -globin gene และมีขนาดชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างจากยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ที่กำลังจะตรวจ

วิธี ASPCR นับเป็นวิธีที่รวดเร็ว และสะดวก ในการตรวจหาความผิดปกติของยีน เนื่องจากขั้นตอนที่ต้องทำการวิเคราะห์ภายหลังขั้นตอน PCR (post PCR) มีเพียงการตรวจหา DNA ที่เพิ่มจำนวนได้โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเท่านั้น

เทคนิค Reverse Dot Blot Hybridization (RDB)

เทคนิค Reverse Dot Blot Hybridization (RDB) อาศัยการออกแบบและสังเคราะห์ Allele Specific Oligonucleotide (ASO) Probe หลายๆ ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งเป็น หมู่อะมิโน (NH_2) นำมายึดติดบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ที่เป็นประจุลบ แล้วนำ DNA ของผู้ป่วยที่ได้ทำ PCR โดยให้นิวคลีโอไทด์บนสาย DNA ติดฉลากด้วย Biotin

มา hybridize กับ ASO Probe บนแผ่นเมมเบรนดังกล่าว แล้วตรวจสอบปฏิกิริยา hybridization ระหว่าง ASO Probe กับ DNA ผู้ป่วย โดยการทำให้ color detection วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจหาความผิดปกติของยีน β -thalassemia ได้หลายชนิดจากการทำ hybridization เพียงครั้งเดียว นับเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว

การตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

วิธีตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) ที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือวิธี chain termination ของ Sanger ซึ่งสามารถพัฒนาใช้ร่วมกับเครื่องอัตโนมัติ ทำให้การอ่านและการวิเคราะห์ผลทำได้สะดวกมากขึ้น อาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดย DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะถูกจำกัดความยาวด้วย dideoxy nucleotide ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัว คือ ddATP, ddGTP, ddCTP และ ddTTP ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน เมื่อนำปฏิกิริยาที่ได้ไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis จะสามารถแยกชิ้นส่วนของ DNA ที่มีความยาวต่างกัน 1 เบสได้ การทำ electrophoresis โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งมีอุปกรณ์การอ่านและการแปลผลข้อมูล จะช่วยอำนวยความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดี

วิธีการ

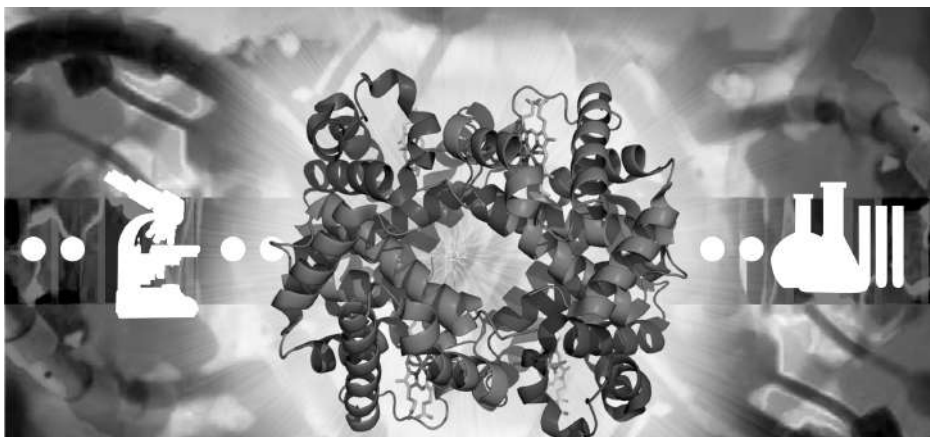
ส่วนใหญ่แต่ละหน่วยงานจะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ขึ้นใช้เอง หลักการวิเคราะห์จึงอาจแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณตัวอย่างส่งตรวจ ตลอดจนความพร้อมของบุคลากรและเครื่องมือ สิ่งที่สำคัญคือจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ก่อนเปิดบริการ เพื่อให้สอดคล้องตามข้อกำหนดในมาตรฐานสากล และมีความมั่นใจในประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์

การรายงานผล

รายงานผล Negative ในกรณีตรวจไม่พบความผิดปกติของยีน β -thalassemia ที่ตรวจสอบ เช่น Negative for β -thalassemia codons 41/ 42 (-TTCT), codon 17 (A-T) and IVS I - 5 (G-C)

รายงานผล Positive for β -thalassemia และระบุความผิดปกติของยีน β -thalassemia ที่ตรวจพบ เช่น Positive for β -thalassemia [Codons 41/42 (-TTCT)]

รายงาน Positive for compound heterozygous β -thalassemia และระบุชนิดของยีนที่ผิดปกติ ในกรณีที่ตรวจพบความผิดปกติของยีน 2 ชนิดร่วมกัน เช่น Positive for compound heterozygous β -thalassemia [Codons 41/42 (-TTCT) and IVS I-5 (G-C)]



ชนิดการผ่าเหล่า β -thalassemia ในคนไทย

No.	Mutations	Type	Mechanism
1.	-28 (TAA <u>A</u> -TAG <u>A</u>)	β^+	Transcriptional mutations
2.	-31 (GCAT-GC <u>G</u> T)		
3.	-86 (CACCC <u>C</u> -CACCC <u>G</u>)		
4.	-87 (CACCC <u>C</u> -CAC <u>A</u> G)		
5.	+1 (A-C)	β^+	Cap site mutation
6.	Init. Codon (A <u>I</u> G-AG <u>G</u>)	β^0	Initiation codon mutation
7.	Codon 8/9 (+G)	β^0	Frameshift mutations
8.	Codon 14/15 (+G)		
9.	Codon 15 (-T)		
10.	Codon 27/28 (+C)		
11.	Codon 41 (-C)		
12.	Codon 41/42 (-TTCT)		
13.	Codon 71/72 (+T)		
14.	Codon 71/72 (+A)		
15.	Codon 95 (+A)		
16.	Codon 123-125 (-ACCCCACC)		
17.	IVS1-1 (G-T)	β^0	RNA processing mutations
18.	IVS1-1 (G-A)	β^0	
19.	IVS1-5 (G-C)	β^+ (severe)	
20.	IVS2#654 (C-T)	β^+ (severe)	
21.	Codon 19 (A <u>A</u> C-A <u>G</u> C)	β^+ (Hb Malay)	
22.	Codon 26 (G <u>A</u> G-A <u>A</u> G)	β^+ (Hb E)	Unstable Hb
23.	Codon 126 (G <u>I</u> G-G <u>G</u> G)	β^+ (Hb Dhonburi or Hb Neapolis)	
24.	Codon 15 (T <u>G</u> G-T <u>A</u> G)	β^0	Nonfunctional mRNA mutations (nonsense mutations)
25.	Codon 17 (A <u>A</u> G-I <u>A</u> G)		
26.	Codon 26 (G <u>A</u> G-I <u>A</u> G)		
27.	Codon 35 (T <u>A</u> C-T <u>A</u> A)		
28.	Codon 43 (G <u>A</u> G-I <u>A</u> G)		
29.	PolyA (AATA <u>A</u> A-AATA <u>G</u> A)	β^+	Polyadenylation mutation
30.	105 bp deletion	β^0	Gene deletions
31.	619 bp deletion		
32.	3485 bp deletion		
33.	45 kb deletion		
34.	12.5 kb deletion	$(\delta\beta)^0$ (mild)	$\delta\beta$ -thalassemia)
35.	Asian Indian inversion deletion	$\delta\beta$ -thalassemia)	
36.	101 kb deletion	$(\gamma\delta\beta)^0$ (mild $\delta\beta$ -thalassemia)	

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำ positive control และ negative control โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการตรวจยืนยันแล้ว ทำปฏิกิริยาควบคู่ไปกับตัวอย่างส่งตรวจทุกครั้ง
2. ควรเข้าร่วมโครงการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับหน่วยงานอื่น หากไม่มีโครงการดังกล่าว อาจเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับหน่วยงานอื่นที่น่าเชื่อถือ (inter-laboratory comparison) เป็นระยะ ๆ ตามความเหมาะสม
3. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษาและสอบเทียบครุภัณฑ์ที่มีผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์
4. บุคลากรที่ปฏิบัติหน้าที่ควรได้รับการฝึกอบรมเป็นประจำอย่างต่อเนื่อง

ข้อจำกัด

เทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR)

1. การตรวจยีน β -thalassemia ด้วยวิธี multiplex ASPCR เมื่อพบผลบวกกับ mutation ชนิดใดชนิดหนึ่งจะสรุปจีโนไทป์ยังไม่ได้จะต้องทำ PCR อีกหลอดด้วย primer ปกติ (N) ที่ codon ที่มี mutation นั้น ถ้าตรวจพบแถบ DNA ที่จำเพาะเมื่อใช้ primer N ด้วย ก็แสดงว่าเป็น heterozygote แต่ถ้าไม่พบก็แสดงว่าเป็น homozygote การตรวจด้วย primer N นี้ จะใช้ในกรณีที่ทำกรตรวจวินิจฉัยตัวอย่างทารกที่พ่อและแม่มี mutation ชนิดเดียวกัน แต่ถ้าพ่อและแม่มี mutation ต่างชนิดกัน เช่น พ่อมี β -thalassemia codon 17 [A-T] แม่มี Hb E ตัวอย่าง DNA ของทารกก็จะตรวจด้วย primer M ของ codon17 [A-T] และ Hb E เท่านั้น

ส่วนการตรวจหา mutation ของยีน β -thalassemia ในหญิงตั้งครรภ์ และหรือคู่สมรสที่มีผลการตรวจคัดกรองเป็นบวก และผลวิเคราะห์ฮีโมโกลบินที่วินิจฉัยได้แล้วว่าเป็นพาหะ β -thalassemia (Hb typing A_2 with high Hb A_2) เมื่อให้ผลบวกกับ mutation ใดแล้วก็ไม่จำเป็นต้องตรวจกับ primer N ต่อ

2. จำเป็นต้องใช้ primer หลายชนิดในการตรวจ แต่ถ้าเลือกศึกษาในกลุ่มประชากรเป้าหมายแล้ว จะมี mutation ที่ต้องตรวจไม่มากนัก

เทคนิค Reverse Dot Blot Hybridization (RDB)

1. กรณีที่เป็น compound heterozygote ของ mutation ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกัน เช่น IVS 1 nt 1 และ IVS 1 nt 5 หรือ codon 17 และ codon 19 จะไม่พบการเกิดสปีน normal probe เนื่องจากตำแหน่งที่ผิดปกติใกล้เคียงกัน ทำให้ normal probe ทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถ hybridize กับ DNA template ได้

2. เป็นวิธีที่ค่อนข้างยากและมีหลายขั้นตอน จึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์สูง

การตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

1. เป็นวิธีที่ค่อนข้างยากและมีหลายขั้นตอน จึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์สูง

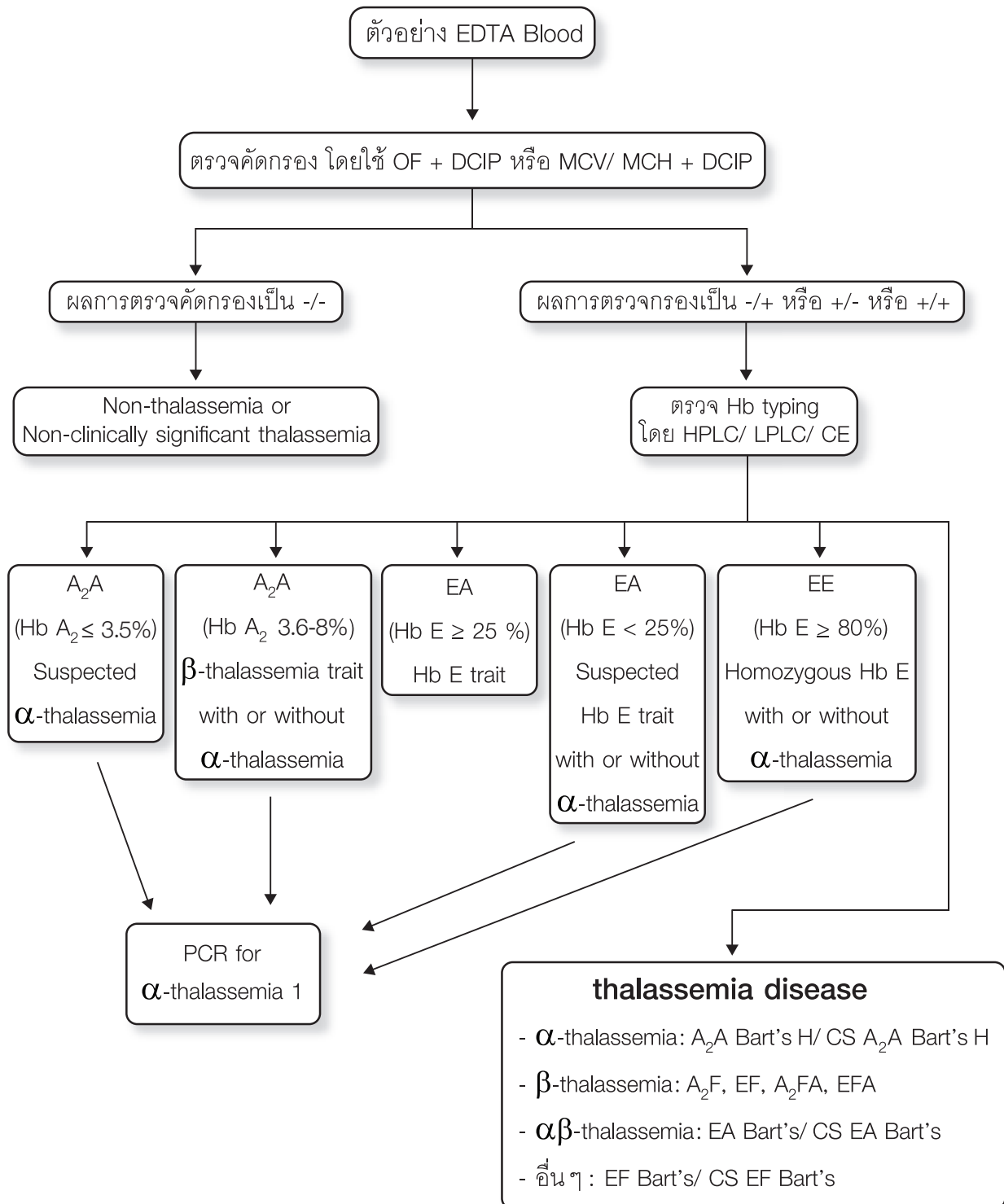
2. เป็นวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่ให้บริการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมในด้านอื่นที่นอกเหนือจากการตรวจหาความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมีย



สรุปแนวทางการดำเนินงาน
ทางห้องปฏิบัติการ
และตารางแสดงชนิดธาลัสซีเมีย
ของคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตร
เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

ภาพสรุปแนวทาง

การดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ



ชนิดธาลัสซีเมียของกลุ่มอาการที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

ธาลัสซีเมียในกลุ่มอาการ	โรคที่เป็นความเสี่ยงของบุตร (โอกาสเป็นโรค)
α -thal 1 trait + α -thal 1 trait	Hb Bart's Hydrop fetalis (1/4)
α -thal 1 trait + Hb H disease	Hb Bart's Hydrop fetalis (1/4)
Hb H disease + Hb H disease	Hb Bart's Hydrop fetalis (1/4)
β -thal trait + β -thal trait	β -thal Major (1/4)
β -thal trait + β -thal Major	β -thal Major (1/2)
β -thal Major + β -thal Major	β -thal Major (100%)
β -thal trait + Hb E trait	β -thal with Hb E (1/4)
β -thal trait + Homo Hb E	β -thal with Hb E (1/2)
β -thal Major + Homo Hb E	β -thal with Hb E (100%)
β -thal with Hb E + Homo Hb E	β -thal with Hb E (1/2)
β -thal with Hb E + β -thal trait	β -thal with Hb E (1/4) และ β -thal Major (1/4)
β -thal with Hb E + β -thal with Hb E	β -thal with Hb E (1/2) และ β -thal Major (1/4)
β -thal with Hb E + β -thal Major	β -thal with Hb E (1/2) และ β -thal Major (1/2)

หมายเหตุ β -thal with Hb E และ β -thal Major บางรายแต่งงานและมีบุตรได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. กุลนภา ฟูเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยและ พัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2549.
2. กุลนภา ฟูเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2551.
3. กุลนภา ฟูเจริญ, สุพรรณ ฟูเจริญ. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในประเทศไทย. วารสารเทคนิคการแพทย และกายภาพบำบัด 2551; 20: 165-176.
4. จิว เซวาร์ถาวร, สุทัศน์ ฟูเจริญ, จินตนา พัฒนพงศ์ธร. ธาลัสซีเมีย คู่มือการวินิจฉัย และแนะนำปรึกษา. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2542.
5. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟูเจริญ และ สุทัศน์ ฟูเจริญ (บรรณาธิการ). ธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR พิมพ์ครั้งที่ 1 โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัย และพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 2541.
6. ปราณี (วินิจจะกุล) ฟูเจริญ. Laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies. การประชุมเชิงปฏิบัติการ (Workshop) Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine. สถาบันวิจัย และพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 9-20 มีนาคม 2541.
7. วิชัย เหล่าสมบัติ. ธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้ง เฮาส์, 2541: 71-124.
8. สาคร วันทอง, กุลนภา ฟูเจริญ, เชี่ยวชาญ สระคูพันธ์, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่อึ้ง, สุพรรณ ฟูเจริญ. การจัดตั้งระบบควบคุมคุณภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียที่โรงพยาบาลเมืองสรวง จังหวัดร้อยเอ็ด. วารสารเทคนิคการแพทย และกายภาพบำบัด 2550; 19: 148-166.
9. สิริภากร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคทางพันธุกรรม พิมพ์ครั้งที่ 1 นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย, 2548.
10. สุทัศน์ ฟูเจริญ, วรวรรณ ต้นไพจิตร, กิตติ ต่อจรัส, วิพร วิประกษิต และอรุโณทัย มีแก้วกฤษกร (บรรณาธิการ). แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี, 2557.
11. สุพรรณ ฟูเจริญ, กุลนภา ฟูเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร 2545; 20: 43-55.
12. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Saeng N, Dangwibul S, Fucharoen S. A simplified screening strategy for thalassemia and haemoglobin E in rural communities in south-east Asia. Bull World Health Organ 2004; 82: 364-372.
13. Sanchaisuriya K, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya P, Changtrakul Y, et al. A reliable screening protocol for thalassemia and hemoglobinopathies in pregnancy; an alternative approach to electronic blood cell counting. Am J Clin Pathol 2005; 123: 113-118.
14. Weatherall DJ, Clegg JB. The laboratory diagnosis of the thalassemias. In: The thalassaemia syndromes. 4rd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 2001: 690.



ภาคผนวก



คำย่อ

ASO	allele specific oligonucleotide
ASPCR	allele specific polymerase chain reaction
CE	capillary electrophoresis
CS	constant spring
DCIP	dichlorophenolindophenol
Hb	hemoglobin
Hct	hematocrit
HPFH	hereditary persistence of fetal hemoglobin
HPLC	high pressure liquid chromatography
LPLC	low pressure liquid chromatography
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCV	mean corpuscular volume
OF	osmotic fragility
PCR	polymerase chain reaction
RDB	reverse dot blot
SEA	Southeast asia
Taq	Thermus aquaticus
Thal	thalassemia



คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ที่ ๖๘๐ /๒๕๕๘

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงาน
การตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

ด้วยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยกลุ่มพันธูกรรมทางคลินิก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์-
สาธารณสุข ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ เพื่อดำเนินงานด้านการ
ควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย

ในการนี้ เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานด้านการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ในการพัฒนา
เครือข่ายการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ให้มีศักยภาพในการ
ให้บริการอยู่บนมาตรฐานเดียวกัน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงแต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงาน
การตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยบุคคลดังต่อไปนี้

๑. นายแพทย์อภิชัย มงคล อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ปรึกษา
๒. ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิง คุณหญิงสุดสาคร ตูจินดา ประธานมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย ที่ปรึกษา
๓. ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงวรรรณ ตันไพจิตร มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ปรึกษา
๔. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวารุณี จินารัตน์ รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ปรึกษา
๕. ดร.อังคณา ทิริญสาดี ที่ปรึกษากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ปรึกษา
๖. นายแพทย์สมชาย แสงกิจพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประธาน
๗. รองศาสตราจารย์ พันเอก นายแพทย์กิตติ ต่อจรัส โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรรมการ
๘. ดร.ปราณี พูเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล กรรมการ
๙. นายแพทย์ชนินทร์ ลีม่วงค์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรรมการ

๑๐. รองศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ พุ้เจริญ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	กรรมการ
๑๑. รองศาสตราจารย์กุลนภา พุ้เจริญ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	กรรมการ
๑๒. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงพิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	กรรมการ
๑๓. รองศาสตราจารย์ ดร.ธนศักดิ์ ตาตุ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	กรรมการ
๑๔. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จำนงค์ นพรัตน์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	กรรมการ
๑๕. นางชวดี นพรัตน์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	กรรมการ
๑๖. นางภัทราภรณ์ บุญจันทร์ โรงพยาบาลราชวิถี	กรรมการ
๑๗. นางนิษฐุชลิย์ ทิริโอดัปปะ ศูนย์อนามัยที่ 1 กรมอนามัย	กรรมการ
๑๘. นางบุษบา เตชาชัยนรินทร์ ศูนย์อนามัยที่ 4 กรมอนามัย	กรรมการ
๑๙. นางสุทัศน์ีย์ วิมลเศรษฐ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
๒๐. นางสาววรางคณา อ่อนทรง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
๒๑. นางสาวอัมรา โยวัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
๒๒. นางสิริภากร แสงกิจพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการและเลขานุการ
๒๓. นางบุญนิภา สุวรรณกาล กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
๒๔. ดร.พีไลลักษณ์ อัครไพบูลย์ โอภาตะ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
๒๕. นางสาวอารีรัตน์ สังข์น้อย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

หน้าที่ความรับผิดชอบ

๑. ทบทวนปัญหา อุปสรรคในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินทางห้องปฏิบัติการ
๒. ทบทวนคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ
๓. พิจารณาแต่งตั้งคณะทำงานได้ตามความเหมาะสม
๔. หน้าที่อื่นๆตามที่ได้รับมอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

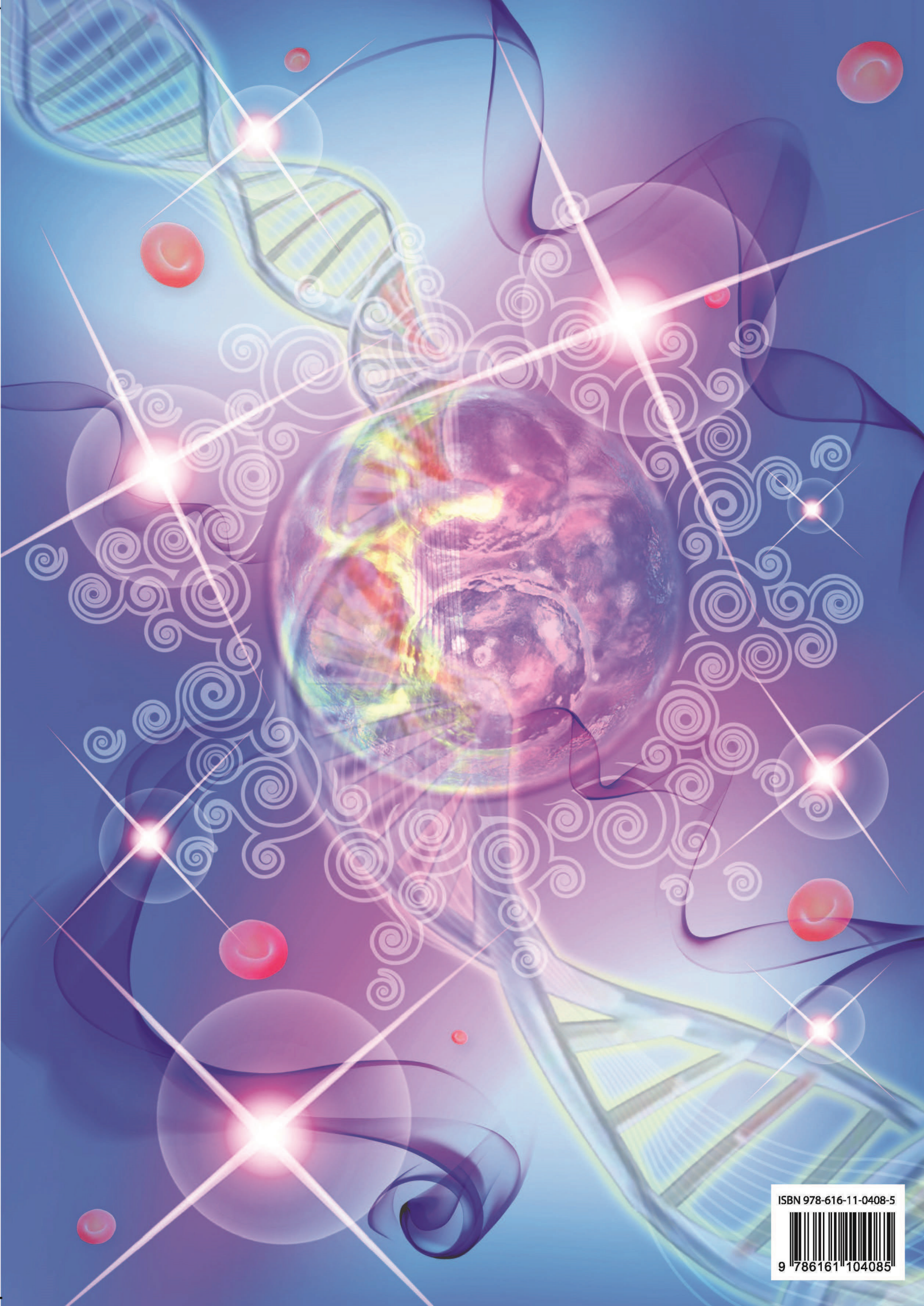
สั่ง ณ วันที่ ๒๗ เมษายน พ.ศ. ๒๕๕๘



(นายอภิชัย มงคล)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ขอขอบคุณคณะผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้เกิดเป็นคณะกรรมการ
ทบทวนคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติฉบับนี้





ISBN 978-616-11-0408-5



9 786161 104085