

คู่มือทางห้องปฏิบัติการ
การตรวจวินิจฉัย

และ ธาราสซีเมีย ฮีโมโกลบิน พืดปกติ

ฉบับปรับปรุง
2567



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences



คู่มือทางห้องปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัย **ธาลัสซีเมีย** **และ** **ฮีโมโกลบิน**ผิดปกติ

ชื่อหนังสือ คู่มือทางห้องปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ
จัดทำโดย คณะกรรมการ/คณะทำงานทบทวนและจัดทำคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ
จัดพิมพ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
โทร. 02 9510000 ต่อ 99325

พิมพ์ครั้งที่ 1	มีนาคม	2552	1,000	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 2	มิถุนายน	2552	2,000	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 3	สิงหาคม	2553	1,000	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 4	พฤษภาคม	2555	600	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 5	มีนาคม	2556	500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 6	มิถุนายน	2558	1,500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 7	กรกฎาคม	2558	500	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 8	กรกฎาคม	2562	700	เล่ม
พิมพ์ครั้งที่ 9	มกราคม	2567	500	เล่ม

พิมพ์ที่ บริษัท พรีเมียร์ มาร์เก็ตติ้ง โซลูชัน จำกัด
9/1 ซอยศรีอักษร ถนนช่องนนทรี
แขวงทุ่งมหาเมฆ เขตสาทร กรุงเทพฯ

ISBN: 978-616-11-5238-3

ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เป็นหน่วยงานหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและป้องกันโรค ผลการตรวจที่น่าเชื่อถือและรวดเร็ว นับเป็นประโยชน์ทั้งในด้านการรักษาและพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยตลอดจนการป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มมากขึ้น

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในฐานะที่มีภารกิจหลักทางห้องปฏิบัติการ เพื่อสนับสนุนการแก้ไขปัญหาสาธารณสุขของประเทศ จึงได้เรียนเชิญคณะผู้เชี่ยวชาญจากมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุข ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยต่าง ๆ และสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติร่วมกันทบทวนคู่มือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ เพื่อเผยแพร่ให้ทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้องถือปฏิบัติให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณคณะผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้เกิดเป็นคณะกรรมการและคณะทำงานทบทวนคู่มือฉบับนี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้อันมีคุณค่าทั้งหมดจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพเครือข่ายห้องปฏิบัติการของประเทศ ให้รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติได้อย่างมีคุณภาพ อยู่บนมาตรฐานเดียวกัน สามารถสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

พงษ์ ธรรมวุฒิ

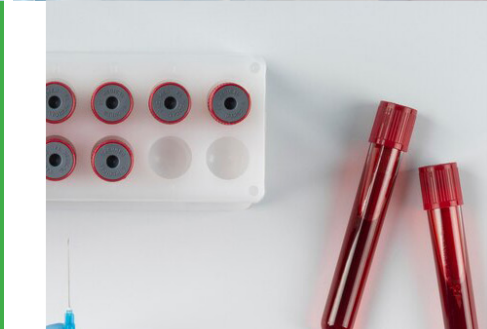
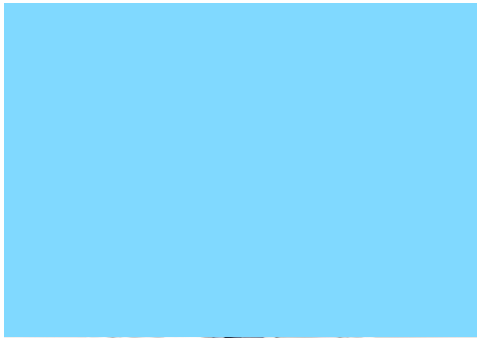
(นายแพทย์ยงยศ ธรรมวุฒิ)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

มีนาคม 2567

นิยามและคำย่อ

คำศัพท์	คำย่อ	นิยาม
α -thalassemia 1 (α^0 -thalassemia)	α -thal 1 (α^0 -thal)	ความผิดปกติของอัลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบินสองยีนบนโครโมโซมข้างเดียวกัน ทำให้ไม่สามารถสร้างสายอัลฟาโกลบินได้
α -thalassemia 2 (α^+ -thalassemia)	α -thal 2 (α^+ -thal)	ความผิดปกติของอัลฟาธาลัสซีเมียเกิดจากการขาดหายไปของยีนอัลฟาโกลบินหนึ่งยีนบนโครโมโซม ทำให้มีการสร้างสายอัลฟาโกลบินลดลง
β^0 -thalassemia	β^0 -thal	ความผิดปกติของเบตาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์สายเบตาโกลบิน ทำให้ไม่สามารถสร้างสายเบตาโกลบินได้
β^+ -thalassemia	β^+ -thal	ความผิดปกติของเบตาธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์สายเบตาโกลบิน ทำให้มีการสร้างสายเบตาโกลบินลดลง
Allele Specific Oligonucleotide	ASO	โอลิโกนิวคลีโอไทด์จำเพาะ
Allele Specific Polymerase Chain Reaction	ASPCR	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำเพาะอัลลีล
Capillary Electrophoresis	CE	กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก
Hb Constant Spring	CS	ฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง
Dichlorophenolindophenol	DCIP	สีสำหรับการตกตะกอนฮีโมโกลบินอี
Dichlorophenolindophenol Precipitation Test	DCIP Precipitation Test	การทดสอบเพื่อการตกตะกอนฮีโมโกลบินอี ด้วยสี DCIP
Hemoglobin	Hb	ฮีโมโกลบิน
Hematocrit	Hct	ค่าปริมาณความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด
Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin	HPFH	ภาวะที่มีฮีโมโกลบินเอฟสูงทางพันธุกรรม
High Pressure Liquid Chromatography	HPLC	โครมาโตกราฟีอัดแรงดัน ประเภทแรงดันสูง
High-Resolution Melting Analysis	HRMA	เทคนิค Real-time PCR ร่วมกับ Dissociation Curve Analysis
Mean Corpuscular Hemoglobin	MCH	ค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง
Mean Corpuscular Volume	MCV	ค่าเฉลี่ยปริมาตรเม็ดเลือดแดง
Osmotic Fragility Test	OF Test	การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดง
Polymerase Chain Reaction	PCR	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
Reverse Dot Blot	RDB	เทคนิคการตรวจจับดีเอ็นเอด้วยการใช้โพรบที่จำเพาะ
Southeast Asia	SEA	เอเชียตะวันออกเฉียงใต้
<i>Thermus aquaticus</i>	Taq	เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส
Thalassemia	Thal	ธาลัสซีเมีย



06 แนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

20 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ ฮีโมโกลบิน

10 การตรวจคัดกรอง

12 การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย ด้วยการทดสอบ ความเปราะของเม็ดเลือดแดง

14 การตรวจคัดกรองฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยน้ำยา DCIP

16 การตรวจคัดกรองฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยวิธี Micro-Column Chromatography

18 การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมีย ด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง





32 การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ
ของยีนที่เป็นสาเหตุของ
 α -thalassemia 1

36 การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติ
ของยีนที่เป็นสาเหตุของ
 β -thalassemia

42 สรุปแนวทางการดำเนินงาน
ทางห้องปฏิบัติการ และตารางแสดง
ชนิดธาลัสซีเมียของคู่สามีภรรยา
ที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย
ชนิดรุนแรง

46 บรรณานุกรม

50 คำสั่งคณะกรรมการ
และคณะทำงาน

แนวทางการตรวจวินิจฉัย

ธาลัสซีเมีย
และฮีโมโกลบินผิดปกติ
ทางห้องปฏิบัติการ

แนวทางการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย และฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ



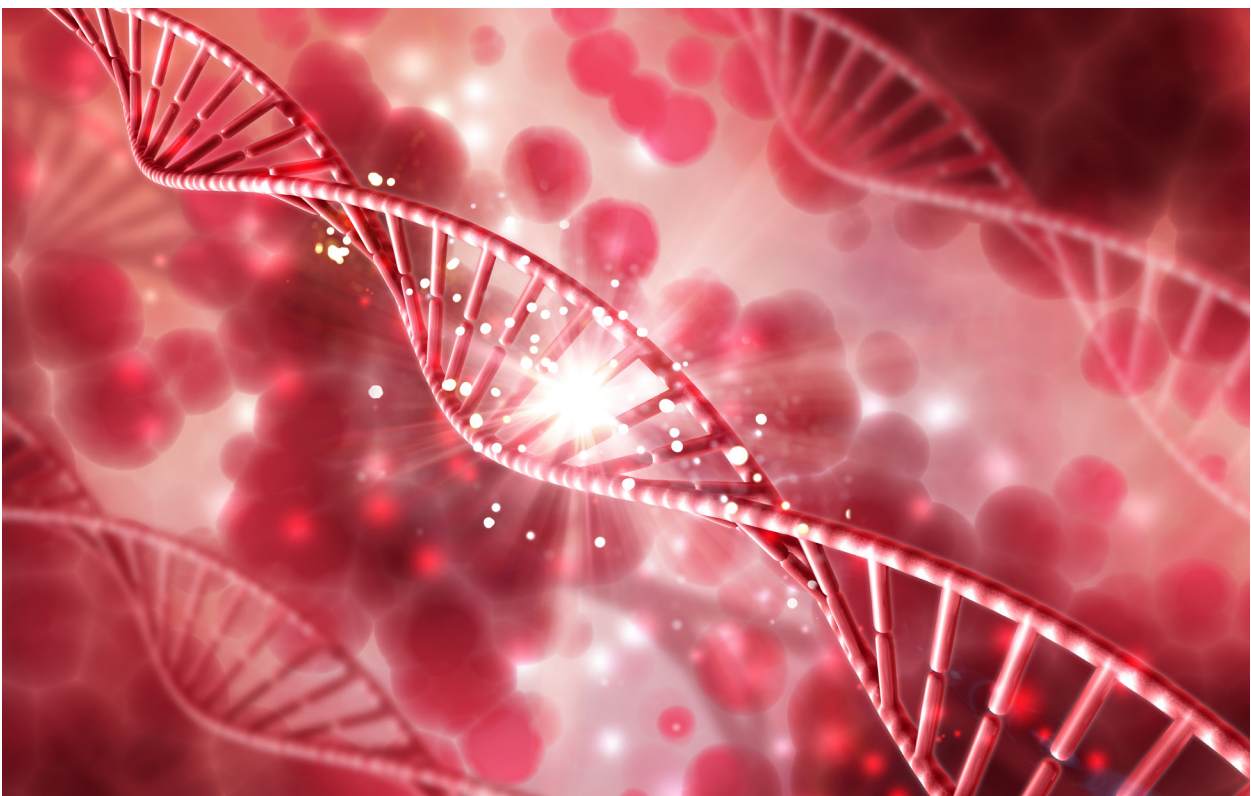
ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางเรื้อรังที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีนที่สังเคราะห์ฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง นำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพกับแทบทุกอวัยวะในร่างกาย ผู้ที่มียีนธาลัสซีเมียมีทั้งผู้ที่เป็นโรค และไม่เป็นโรคหรือพาหะ ผู้ที่เป็นโรคมีอาการแตกต่างกัน ตั้งแต่มีโลหิตจางเล็กน้อย โลหิตจางมาก เรื้อรัง ไปจนถึงอาการรุนแรงมาก จนเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาหรือหลังคลอดไม่นาน ส่วนผู้ที่เป็นพาหะมีสุขภาพปกติเหมือนคนทั่วไป แต่สามารถถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติไปสู่ลูกหลานได้

อุบัติการณ์ในประเทศไทยพบว่า ประชากรที่เป็นพาหะประมาณร้อยละ 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 การให้ความรู้แก่ประชาชน และบุคลากรทางสาธารณสุข การตรวจหาผู้ป่วยและพาหะ การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นับเป็นหน่วยงานที่มีบทบาทสำคัญทั้งในด้านการตรวจหาผู้ป่วยและพาหะ ตลอดจนการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ซึ่งให้ข้อมูลสำคัญนำไปใช้ในการให้คำแนะนำทางพันธุกรรม และช่วยในการตัดสินใจสำหรับสามีภรรยาคู่เสี่ยงที่มีโอกาส

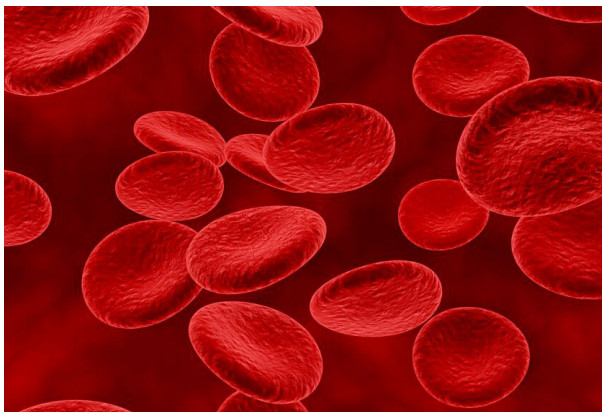
ให้กำเนิดบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 3 โรคตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ Homozygous α -thalassemia 1, Homozygous β -thalassemia และ β -thalassemia/ Hb E

เนื่องจากชนิดของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรไทยมีความหลากหลาย จึงไม่มีการทดสอบใดการทดสอบหนึ่งทางห้องปฏิบัติการที่สามารถให้การวินิจฉัยได้ครอบคลุมความผิดปกติได้ทุกชนิด โดยทั่วไปการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในหญิงตั้งครรภ์และคู่สมรสมี 3 ระดับ ดังนี้





ระดับที่ 1 การตรวจคัดกรอง (Screening tests) เป็นขั้นตอนแรกที่มีเป้าหมายหลักในการคัดกรองคนปกติหรือคนที่มีความผิดปกติชนิดที่ไม่รุนแรงออกไป เพื่อจะได้ไม่ต้องตรวจเลือดต่อและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย คงเหลือแต่ผู้ที่น่าจะมีความผิดปกติของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่อาจก่อให้เกิดอาการรุนแรงได้ที่ต้องเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป



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



ระดับที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) ใช้ในกรณีที่ผลตรวจ Hb typing ในระดับที่ 2 ไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้ชัดเจน หรือกรณีต้องการทราบชนิดของมิวเตชันของธาลัสซีเมียที่วินิจฉัยในระดับที่ 2 และกรณีการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

การดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการทุกขั้นตอนล้วนมีความสำคัญทั้งสิ้น บุคลากรที่เกี่ยวข้องควรพิจารณาให้เหมาะสมตามหลักวิชาการ และสอดคล้องกับข้อกำหนดด้านคุณภาพ เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ สามารถสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจคัดกรอง

การตรวจคัดกรอง



การตรวจคัดกรองเป็นการทดสอบอย่างง่าย มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง และบุคลากรที่มีความชำนาญมากนัก สามารถทำได้ในโรงพยาบาลทุกระดับ คลินิก และสถานีนานามัยต่างๆ การตรวจคัดกรองมีเป้าหมายหลักในการคัดกรองคนปกติ หรือมีความผิดปกติชนิดที่ไม่รุนแรงออกไป เพื่อจะได้ไม่ต้องตรวจเลือดต่อเนื่องและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ดังนั้นผลการตรวจคัดกรองจะต้องมีความไวสูง อาจมีผลบวกปลอมได้บ้าง รายที่ผลการตรวจคัดกรองเป็นลบไม่จำเป็นต้องนำไปตรวจยืนยันต่อ การตรวจคัดกรองจึงช่วยลดภาระงานและค่าใช้จ่ายในการตรวจทางห้องปฏิบัติการลงได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องดำเนินงานในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ในระดับประเทศ

ในประเทศไทยการตรวจคัดกรองที่เกี่ยวข้องในการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข มี 3 การทดสอบคือ

1. การตรวจ Osmotic Fragility (OF) Test
2. การตรวจ Dichlorophenolindophenol (DCIP) Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography
3. การตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (MCV/ MCH)

การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรไทยสามารถเลือกทำได้จาก 2 แนวทาง ดังนี้

แนวทางที่ 1 ประกอบด้วยการตรวจ Osmotic Fragility (OF) Test ร่วมกับการตรวจ Dichlorophenolindophenol (DCIP) Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography

แนวทางที่ 2 ประกอบด้วยการตรวจดัชนีเม็ดเลือดแดง (MCV, MCH) ร่วมกับการตรวจ Dichlorophenolindophenol (DCIP) Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography

การตรวจ OF Test และ MCV/ MCH ใช้ในการตรวจคัดกรองความผิดปกติที่มีสาเหตุจาก α -thalassemia และ β -thalassemia ส่วน DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography ใช้ในการตรวจ Hb E

การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยการทดสอบความเปราะ ของเม็ดเลือดแดง (Osmotic Fragility Test: OF Test)

หลักการ

เม็ดเลือดแดงปกติเมื่ออยู่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 จะคงสภาพปกติไว้ได้ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำเกลือลงเรื่อยๆ น้ำจะแพร่เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เซลล์บวมขึ้น จนถึงความเข้มข้นของเกลือระดับหนึ่งเม็ดเลือดแดงจะแตก การที่เม็ดเลือดแดงแตกง่าย (Increased Osmotic Fragility) หรือแตกยาก (Decreased Osmotic Fragility) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของพื้นที่ผิวน้ำเกลือต่อความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ซึ่งส่วนใหญ่ คือ ฮีโมโกลบิน เม็ดเลือดแดงที่มีอัตราส่วนนี้สูง เช่น Target cell และ Hypochromic cell จะแตกง่าย ในขณะที่ Spherocyte จะแตกง่าย ดังนั้นในการทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงซึ่งปกติจะแตกได้หมด แต่เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยธาลัสซีเมียและพาหะธาลัสซีเมียที่มี Target cell และ Hypochromic cell จะไม่แตก อย่างไรก็ตาม ภาวะอื่นที่ทำให้เม็ดเลือดแดงมีลักษณะเป็น Hypochromic cell เช่น ภาวะโลหิตจางจากการขาดเหล็ก หรือเป็น Target cell เช่น ในผู้ป่วยโรคตับ สามารถให้ผลบวกปลอมได้

สารเคมีและน้ำยา

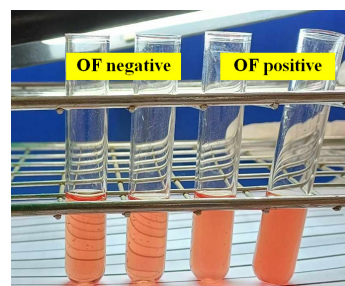
ปัจจุบันมีน้ำยาลำเร็จรูปหลายชนิดจำหน่าย การเลือกใช้ควรพิจารณาให้รอบคอบตามข้อกำหนดด้านคุณภาพและข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ

วิธีการ

- เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่กำหนด

การรายงานผล

- เมื่อได้ผลลบ เม็ดเลือดแดงแตกมากกว่าร้อยละ 95 สารละลายใส รายงานผล “Negative”
- เมื่อได้ผลบวก เม็ดเลือดแดงแตกไม่หมด สารละลายขุ่น รายงานผล “Positive”



หมายเหตุ.
จาก หน่วยบริการธาลัสซีเมีย
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การแปลผล

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

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

ข้อจำกัดของการทดสอบ

1. การทดสอบ OF Test เป็นการตรวจคัดกรองที่มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรอง α -thalassemia 1 และ β -thalassemia เป็นหลักเท่านั้น ไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยชนิดของความผิดปกติได้

2. ผู้ที่เป็นพาหะ Hb E บางรายอาจให้ผลบวก บางรายอาจให้ผลลบกับการทดสอบนี้

3. อาจพบผลบวกหลงในภาวะโลหิตจาง จากการขาดเหล็ก และจากความผิดปกติอื่นๆ ที่พบ Target cell เช่น โรคตับ

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำยาก่อนนำมาใช้ในงานบริการ โดยทำการทดสอบกับเลือดควบคุมคุณภาพ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกตัวอย่างเลือดควบคุมคุณภาพจากเลือดของผู้ใหญ่ในงานประจำวัน 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 ตัวอย่างไว้ในตู้เย็น 2-8°C สำหรับใช้เป็นเลือดควบคุมคุณภาพน้ำยาสำหรับการทดสอบในวันต่อไป และเก็บใหม่วันต่อไปเรื่อย ๆ

2. การเก็บตัวอย่างเลือดที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ผลการตรวจผิดพลาดได้ เช่น ปริมาณเลือดกับ EDTA มีสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม ถ้าปริมาณเลือดน้อย EDTA เหลือมาก จะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงเหี่ยว (Crenated RBC) จะให้ผลบวกปลอมต่อการทดสอบได้ในทำนองตรงข้าม ถ้าเจาะเลือดมากเกินไปหรือผสมเลือดกับสารกันเลือดแข็งไม่ดี ทำให้เลือดบางส่วนแข็งตัว

(Partial clot) ส่งผลให้การตรวจไม่ถูกต้อง

หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันทีหลังได้รับเลือด ควรเก็บไว้ในตู้เย็น 2-8°C ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 48 ชั่วโมง ถ้าไม่มีตู้เย็นต้องเก็บในกระติกที่มีน้ำแข็ง และทำการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเลือดเก่าเม็ดเลือดแดงบางส่วนมีการเสื่อมสภาพทำให้ตรวจง่าย เกิดผลลบปลอมได้

3. การควบคุมคุณภาพวิธีการทดสอบ

- น้ำยาที่เก็บในตู้เย็น ควรนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องไม่น้อยกว่า 15 นาที และเขย่าก่อนนำมาใช้งาน

- ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) ควรใช้ของใหม่ เนื่องจากปิเปตต์ทิปที่นำมาล้างเพื่อใช้ใหม่ อาจมีสารตกค้าง และไม่แห้งสนิท ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเกิดผลลบปลอมได้

- ไม่ควรใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ผสมเลือดกับน้ำยา เพราะจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกจากแรงเหวี่ยง ทำให้เกิดผลลบปลอมได้

- ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาก่อนอ่านผล จะต้องปฏิบัติตามรายละเอียดในเอกสารกำกับน้ำยาอย่างเคร่งครัด เพื่อให้เม็ดเลือดแดงปกติแตกอย่างสมบูรณ์

4. การอ่านผลไม่ควรนำมาอ่านผลที่ละเอียด ควรใส่ Rack ยกขึ้นอ่านที่แสงแว่น ประมาณ 10-12 หลอด จะได้มีผลการทดสอบทั้งบวกและลบเปรียบเทียบไปพร้อมกัน โดยมีโคมไฟให้แสงพอดี (ไม่จ้าเกินไป) ส่องจากด้านบนลงมาที่หลอด ตัวอย่างที่ให้ผลขุ่นไม่ชัดเจน (Weakly positive หรือ Suspicious) มักเป็นตัวอย่างเลือดของผู้ที่เป็นพาหะ Hb E บางราย และพาหะ α -thalassemia 2 สำหรับในกรณีที่เป็นพาหะ Hb E ถ้าทำการตรวจคัดกรอง DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography ด้วยตัวอย่างเหล่านั้นก็จะให้ผลบวกชัดเจนกับ DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography

การตรวจคัดกรองฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยน้ำยา DCIP Dichlorophenolindophenol Precipitation Test

หลักการ

Hb E ($\alpha_2\beta_2^{26\text{Glu-Lys}}$) เป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 26 ของสาย β -globin เปลี่ยนจากกรดกลูตามิก (Glutamic: Glu) เป็นไลซีน (Lysine: Lys) ทำให้โครงสร้างที่จุดสัมผัสระหว่างสายโกลบิน $\alpha_1\beta_1$ ไม่แข็งแรง เมื่ออยู่ในสารละลาย DCIP จะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นโกลบินสายเดี่ยวที่มีซัลโฟไฮดริลอิสระจึงตกตะกอนได้ง่าย และเร็วกว่าฮีโมโกลบินปกติ โดยปริมาณความขุ่นของตะกอนที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างเลือดของ Hb E Homozygote จะมากกว่าของพาหะ Hb E

สารเคมีและน้ำยา

ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปหลายชนิดจำหน่าย การเลือกใช้ควรพิจารณาให้รอบคอบตามข้อกำหนดด้านคุณภาพ และข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ

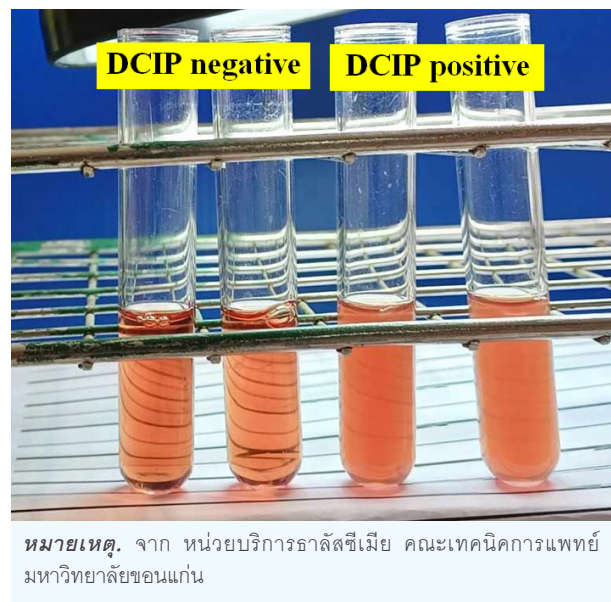
วิธีการ

- เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่กำหนด



การรายงานผล

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



การแปลผล

Negative: ไม่มี Hb E

Positive: อาจเป็นผู้ที่มี Hb E ซึ่งพบได้ทั้งที่เป็นพาหะ Hb E, Hb E Homozygote หรือ α -thalassemia และ/หรือ 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 A₂A

ตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control)

เป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดของ Hb เป็น EA

ไม่ควรใช้ EE เพราะให้ผลบวกแรงเกินไป

ห้องปฏิบัติการสามารถเก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าวไว้ในตู้เย็น 2-8°C สำหรับใช้เป็นเลือดควบคุมคุณภาพต่อไปได้ 1 สัปดาห์

ในกรณีที่ไม่สามารถหาตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้ ผู้ปฏิบัติสามารถใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจคัดกรองที่ให้ผลการตรวจเป็นบวก และลบอย่างละ 1-2 ราย เก็บไว้ในตู้เย็น 2-8°C เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบครั้งต่อไป และเก็บเลือดใหม่ทุกครั้งที่ทำทดสอบไปเรื่อย ๆ

2. ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบควรเป็นเลือดที่เจาะใหม่ในวันนั้น หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันที ควรเก็บเลือดไว้ในตู้เย็น 2-8°C และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ แต่ถ้าไม่มีตู้เย็นเก็บ ควรทำการทดสอบภายใน 48 ชั่วโมง เนื่องจากเลือดที่เก่าฮีโมโกลบินบางส่วนจะถูกออกซิไดซ์ไปแล้ว สังเกตได้จากเลือดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงคล้ำ ไม่ใช่แดงสดเหมือนเลือดเจาะใหม่ เมื่อนำไปทำ

ปฏิกิริยากับ DCIP จะตกตะกอนได้ง่ายขึ้น จนเกิดผลบวกปลอมได้

3. อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยาจะต้องเท่ากับ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และเวลาที่ให้ทำปฏิกิริยาจะต้องตรงตามที่ระบุในเอกสารกำกับน้ำยา ดังนั้นอ่างน้ำหรือบล็อกควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) จะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของอุณหภูมิเป็นประจำ เพราะถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 36°C จะให้ผลลบปลอม แต่ถ้ามากกว่า 38°C ก็จะทำให้ผลบวกปลอมได้ หากทำการทดสอบแล้ว มีผลลบหรือบวกทุกตัวอย่างให้ตรวจสอบเรื่องอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยาเป็นอันดับแรก สำหรับประเด็นในเรื่องเวลาทำปฏิกิริยา จะพบความผิดพลาดได้มากกว่า ถ้าผู้ปฏิบัติทำการทดสอบครั้งละหลายตัวอย่าง (เช่น มากกว่า 10 ตัวอย่างต่อครั้ง) โดยเฉพาะถ้าทำการทดสอบในห้องที่ไม่ได้ปรับอากาศ และมีอุณหภูมิห้องสูงกว่า 30°C ตัวอย่างแรก ๆ ที่เติมเลือดลงไปใต้น้ำยาระหว่างที่รอเติมตัวอย่างเลือดรายต่อไป จนครบรายสุดท้ายได้เกิดปฏิกิริยาไปบางส่วนแล้ว เมื่อนำไปอุ่นต่ออีก 15 นาที อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

4. การควบคุมคุณภาพการอ่านผลทำเช่นเดียวกับการอ่านผล OF Test

ข้อควรระวัง

น้ำยา DCIP เป็นน้ำยาสีน้ำเงินเข้ม มีความไวต่อแสง อากาศ และอุณหภูมิที่สูง จึงต้องเก็บน้ำยาในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท บรรจุในกล่องเพื่อไม่ให้โดนแสง เก็บในตู้เย็น 2-8°C

การตรวจคัดกรองฮีโมโกลบิน อี (Hb E) ด้วยวิธี Micro-Column Chromatography

หลักการ

อาศัยหลักการ Ionic exchange โดยใช้คุณสมบัติชนิดและโครงสร้างของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ซึ่งมีประจุแตกต่างกัน เมื่อฮีโมโกลบินอยู่ในสารละลายที่เป็นด่าง (Alkaline pH) ฮีโมโกลบินจะเกิดประจุไฟฟ้าเมื่อนำสารละลายที่มีฮีโมโกลบินผ่านลงในคอลัมน์ที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchanger) ได้แก่ Q Sepharose หรือ Diethylamino ethyl (DEAE) Sephadex ฮีโมโกลบินโมเลกุลทุกตัวจะถูกคอลัมน์ดักจับไว้ และเมื่อนำน้ำยา (Eluting buffer) ที่เพิ่มปริมาณของ Chloride ion (Cl⁻) ซึ่งมีประจุลบผ่านลงในคอลัมน์ ฮีโมโกลบินอีจะถูกแทนที่และไหลออกจากคอลัมน์ก่อนฮีโมโกลบินชนิดอื่นๆ และมองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นสารละลายสีแดงหรือสีชมพูอ่อน ซึ่งความเข้มของสีจะแปรผันตามปริมาณของฮีโมโกลบินอี

สารเคมีและน้ำยา

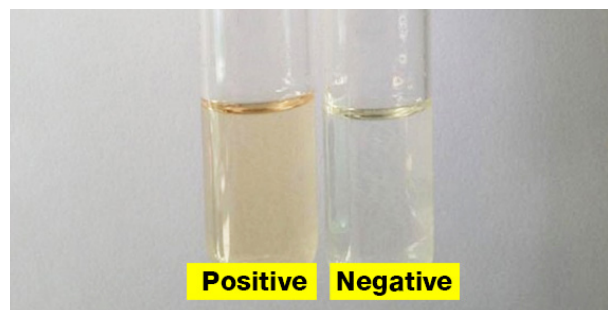
ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปหลายชนิดจำหน่าย การเลือกใช้ควรพิจารณาให้รอบคอบตามข้อกำหนดด้านคุณภาพและข้อมูลอ้างอิงทางวิชาการ

วิธีการ

- เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่กำหนด

การรายงานผล

- เมื่อได้ผลลบ สารละลายใส ไม่มีสี รายงานผล “Negative”
- เมื่อได้ผลบวก สารละลายมีสีแดงหรือแดง-ชมพูอ่อน รายงานผล “Positive”



หมายเหตุ: จาก หน่วยวิจัยธาลัสซีเมีย ศูนย์วิจัยโลหิตวิทยา
โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

การแปลผล

Negative: ไม่มี Hb E

Positive: อาจเป็นผู้ที่มี Hb E ซึ่งพบได้ทั้งที่เป็นพาหะ Hb E, Hb E homozygote หรือ α -thalassemia และ/หรือ β -thalassemia ที่มี Hb E ร่วมด้วย ต้องส่งตัวอย่างเลือดตรวจ Hb typing ต่อไป

ข้อจำกัดของการทดสอบ

Hb A₂, Hb S, Hb D, Hb G รวมทั้ง Abnormal Hb ชนิดอื่นๆ เช่น Hb Q Thailand, Hb H Constant Spring สามารถถูกแทนที่ได้บางส่วนและไหลออกจากคอลัมน์พร้อมกับ Hb E อย่างไรก็ดี เนื่องจากฮีโมโกลบินเหล่านี้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของ Hb E ทำให้ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จึงมักไม่มีปัญหาการแปลผล

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำยาก่อนนำมาใช้ในงานบริการ โดยทำการทดสอบกับเลือดควบคุมคุณภาพ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกตัวอย่างเลือดควบคุมคุณภาพจากเลือดผู้ใหญ่ในงานประจำวัน ดังนี้

ตัวอย่างควบคุมผลลบ (Negative control)

เป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดของ Hb เป็น A₂A

ตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control)

เป็นตัวอย่างเลือดที่มีชนิดของ Hb เป็น EA

ห้องปฏิบัติการสามารถเก็บตัวอย่างเลือดดังกล่าวไว้ในตู้เย็น 2-8°C สำหรับใช้เป็นเลือดควบคุมคุณภาพต่อไปได้ 3 วัน

ในกรณีที่ไม่สามารถหาตัวอย่างเลือดดังกล่าวได้ ผู้ปฏิบัติสามารถใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการตรวจคัดกรองที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกและลบอย่างละ 1-2 ราย เก็บไว้ในตู้เย็น 2-8°C เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพ

สำหรับการทดสอบครั้งต่อไปและเก็บเลือดใหม่ทุกครั้ง ที่ทำการทดสอบไปเรื่อย ๆ

2. ตัวอย่างเลือดที่นำมาทดสอบควรเป็นเลือดที่เจาะใหม่ในวันนั้น หากไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันที ควรเก็บเลือดไว้ที่ตู้เย็น 2-8°C และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 สัปดาห์

3. ระดับความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณคลอไรด์ (Cl) ในน้ำยาทดสอบเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบ ในกรณีที่ใช้น้ำยาที่เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ การเปลี่ยนค่าความเป็นกรดต่าง หรือการเปลี่ยนปริมาณคลอไรด์ในน้ำยาที่ใช้แทนที่อีโมโกลบิน (Eluting buffer) อาจทำให้เกิดผลบวก หรือลบปลอม

ข้อควรระวัง

1. ควรเก็บชุดน้ำยาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$)
2. ควรเก็บชุดน้ำยาให้พ้นจากบริเวณที่มีความชื้นและความร้อนสูง
3. ไม่ควรใช้ชุดน้ำยาที่หมดอายุแล้ว



การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง

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 -thalassemia 1 และ β -thalassemia

วิธีการและการรายงานผล

รายงานค่าตามที่วิเคราะห์ได้

การแปลผล

$MCV < 80 \text{ fL}$ และ/หรือ $MCH < 27 \text{ pg}$ อาจเป็น α -thalassemia และ/หรือ β -thalassemia และ/หรือ Hb E โดย α -thalassemia มีโอกาสเป็นได้ทั้งชนิด α -thalassemia 1 และ α -thalassemia 2 ส่วน β -thalassemia มีโอกาสเป็นได้ทั้ง 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 Paksé หรืออาจมี Hb E

ข้อจำกัดของการทดสอบ

1. การตรวจคัดกรองด้วยค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง จำเป็นต้องทำการทดสอบกับเลือดที่เจาะใหม่หรือที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น $2-8^\circ\text{C}$ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่มีชีวิต มีการใช้พลังงานในกระบวนการเมตาบอลิซึมเพื่อคงสภาพเซลล์ไว้ตลอดเวลา เมื่อพลังงานลดลงเซลล์เม็ดเลือดแดงก็จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและแตกในที่สุด

2. ประมาณร้อยละ 20-40 ของพาหะ Hb E มีค่า MCV และ MCH มากกว่า 80 fL และ 27 pg ตามลำดับ จึงจำเป็นต้องตรวจด้วยวิธี DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography ร่วมด้วย

การควบคุมคุณภาพ

ห้องปฏิบัติการต้องมีแนวทางการปฏิบัติงานเพื่อคงมาตรฐานเครื่องมือตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด รวมทั้งมีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (Internal Quality Control) ด้วยวัสดุควบคุมคุณภาพที่ได้มาตรฐาน และเข้าร่วมเป็นสมาชิก External Quality Assurance หรือ Proficiency Testing Program และมีการบำรุงรักษาเครื่องมือเป็นประจำสม่ำเสมอ



การตรวจวิเคราะห์
ชนิดและปริมาณ
ฮีโมโกลบิน
(Hb typing & Quantitation)

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน (Hb typing & Quantitation)

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบิน เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ นิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ อาทิ ความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงาน เครื่องสามารถตรวจได้ทั้งชนิดและปริมาณของฮีโมโกลบินได้อย่างต่อเนื่องในขั้นตอนเดียวกัน จึงไม่ยุ่งยากและไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูง อีกทั้งยังมีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ปัจจุบันเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฮีโมโกลบินที่มีใช้ในประเทศไทย 2 หลักการ คือ

1. หลักการโครมาโตกราฟีอัดแรงดัน ประเภทแรงดันสูง (High Pressure Liquid Chromatography: HPLC) โดยมีหลักการ คือ เป็นคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดบวก (Cation Exchange Column Chromatography) ส่วนคอลัมน์บรรจุอนุภาคนาโนขนาดเล็ก (Spherical silica gel) เคลือบด้วยสารคาร์บอกซิล (Carboxyl) ซึ่งมีประจุลบ ทำหน้าที่เป็น Stationary phase จับกับประจุบวกของฮีโมโกลบินที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ทางระบบส่งสารตัวอย่าง (Sample injector) จากนั้นฮีโมโกลบิน แต่ละชนิดจะถูกชะล้าง (Elute) ออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ (Mobile phase) ที่มีความแรงของประจุ (Ionic strength) สูงกว่าความแรงของประจุของฮีโมโกลบินที่จับอยู่กับ Stationary phase แต่เนื่องจากในตัวอย่างไม่เลือกมีฮีโมโกลบินปนกันหลายชนิด แต่ละชนิดมี Ionic strength ไม่เท่ากัน เครื่องอัตโนมัติจึงต้องมีโปรแกรมควบคุมการผสมบัฟเฟอร์ 2 ชนิด ที่มี Ionic strength ต่างกัน เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Ionic strength ที่เหมาะสมสำหรับฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ระยะเวลา

ที่ฮีโมโกลบินแต่ละชนิดคงอยู่ในคอลัมน์เรียกว่า Retention time (RT) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละฮีโมโกลบิน จากนั้นฮีโมโกลบินที่ถูกชะออกมาจะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer detector) ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม แล้วส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผลเพื่อวิเคราะห์ฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ อ้างอิงตาม RT ของฮีโมโกลบินมาตรฐาน และรายงานผลเป็น 2 ลักษณะ คือ รายงานโครมาโตแกรม แสดงการดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบินที่ถูกชะล้างผ่านคอลัมน์ออกมาในเวลาต่าง ๆ (หรือนิยามเรียกกันว่า Peak) และรายงานปริมาณฮีโมโกลบินแต่ละชนิดตามพื้นที่ใต้กราฟในช่วงเวลาที่กำหนด

2. หลักการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงในหลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็ก (Capillary Electrophoresis) อาศัยการแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูง (10,000-30,000 Volts) ผ่านตัวกลาง คือ หลอดแก้วนำไฟฟ้าขนาดเล็กมาก (Silica capillary) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25-100 ไมโครเมตร (High Voltage Capillary Electrophoresis) โดยปลายทั้งสองข้างของหลอดแก้วจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่าง (Alkali buffer pH 9.4) เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าไปจะเกิดการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ที่มีประจุสุทธิแตกต่างกันไปตามแรงขับเคลื่อนไฟฟ้า (Electro osmotic flow) โดยตัวอย่างจะถูกปล่อยเข้าไปในหลอดแก้วทางด้านหัวบวก เคลื่อนที่ไปยังหัวลบผ่านเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (Detector) และระบบแปลงสัญญาณแล้วรายงานผลออกมา เรียกว่า Electropherogram (เทียบได้กับ

Chromatogram จากเครื่อง HPLC) โดยก่อนการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือดจะมีการปรับมาตรฐานตำแหน่งของฮีโมโกลบินให้ Hb A อยู่ตรงกลางของหน้าต่าง Electropherogram จากตัวอย่างควบคุมคุณภาพก่อน โดยฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่มีในตัวอย่างเลือดจะถูกกำหนดเป็นโซนเรียกว่า โซน 1 ถึง โซน 15 ใน Electropherogram ที่ปรากฏโดยอ้างอิงจาก Hb A และหรือ Hb A₂ ของตัวอย่างนั้น ในกรณีที่ตัวอย่างเลือดที่ตรวจวิเคราะห์ไม่มี Hb A และหรือ Hb A₂ เครื่องจะอ้างอิงชนิดฮีโมโกลบินจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ก่อนหน้านี้ และจะไม่ปรากฏแถบโซนใน Electropherogram

วัสดุอุปกรณ์ น้ำยา และวิธีการ

เครื่องมือของแต่ละบริษัทมีรายละเอียดแตกต่างกันไป ผู้ปฏิบัติควรได้รับการฝึกอบรมทั้งในด้านการเตรียมตัวอย่างเลือด การใช้และบำรุงรักษาเครื่องมือ ตลอดจนการอ่าน และการวิเคราะห์ผลจากผู้เชี่ยวชาญของบริษัท และผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาที่เกี่ยวข้องก่อนการให้บริการทางห้องปฏิบัติการ

การรายงานผล

เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติระบบคอลัมน์โครมาโตกราฟี (HPLC)

รายงานชนิดฮีโมโกลบินจากโครมาโตแกรมที่ปรากฏออกมาจากส่วนแสดงผล พร้อมทั้งรายงานปริมาณ Hb A₂/E และ Hb F ที่เครื่องคำนวณให้ โดยการรายงานชนิดฮีโมโกลบินที่พบบ่อยในประเทศไทย คือ Hb Constant Spring, Hb A₂/E, Hb F, Hb A, Hb Bart's และ Hb H

เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติหลักการ Capillary Electrophoresis

รายงานชนิดฮีโมโกลบินตามลักษณะ Electropherogram ที่ปรากฏและปริมาณฮีโมโกลบินชนิดต่างๆ ที่เครื่องวิเคราะห์ให้เหมือนกับ การตรวจวิเคราะห์ด้วยระบบอื่นๆ แต่เนื่องจากเครื่อง High Voltage Capillary Electrophoresis มีศักยภาพในการแยก Hb A₂ กับ Hb E ออกจากกันได้ ในขณะที่เครื่องอื่นที่อาศัยหลักการคอลัมน์โครมาโตกราฟี ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ค่าอ้างอิงของ Hb A₂ และ Hb E ในผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ที่มี Hb E จึงแตกต่างจากเครื่องอื่นๆ ซึ่งปริมาณ Hb E ที่วัดได้ จะมีปริมาณ Hb A₂ รวมอยู่ด้วย หากต้องการใช้ค่าอ้างอิงตามที่ยอมรับกันในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งพาหะ Hb E ที่สงสัยว่าจะมียืนแฝง α -thalassemia 1 ซึ่งใช้ค่า cut off ที่ Hb E < 25% สามารถทำได้โดยการรวมปริมาณ Hb A₂ กับ Hb E เข้าด้วยกันได้

การแปลผลการวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน (Hb Typing) ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 1 ปี ที่พบบ่อยในประชากรไทย (กรณีที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี การแปลผลควรปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ)

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 ออกจากคนปกติที่ไม่เป็นธาลัสซีเมียหรือผู้ที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดไม่รุนแรงได้ หากผลการตรวจพบ Hb typing เป็น A_2A โดย Hb A_2 น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.5% ห้องปฏิบัติการสามารถแปลผลเป็น Normal Hb typing, Not rule out α -thalassemia

2. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A_2A และปริมาณ Hb $A_2 > 3.5\%$ แปลผลเป็น β -thalassemia trait with or without α -thalassemia ส่วนใหญ่มีปริมาณ Hb A_2 ประมาณ 3.6-8% MCV ประมาณ 60-75 fL ผลการตรวจ blood smear พบเม็ดเลือดแดงผิดปกติเล็กน้อย หากทำการตรวจคัดกรองด้วย OF Test และ DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography จะให้ผลบวกกับการทดสอบ OF Test แต่ให้ผลลบกับการทดสอบ DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography

หมายเหตุ

- ในพาหะ β -thalassemia ที่มี α -thalassemia 1 ร่วมด้วย (Double heterozygote) ปริมาณ Hb A_2 อาจต่ำกว่า 4% และค่า MCV อาจจะสูงขึ้นเป็น 78-80 fL

- จากการศึกษาผู้ที่มี Hb A_2 อยู่ระหว่าง 3.5-4.0 % พบว่าตรวจพบผู้ที่เป็นพาหะ β -thalassemia ได้ประมาณร้อยละ 10-11 และส่วนใหญ่เป็นพาหะของ β^+ -thalassemia ที่เหลือพบเป็นความผิดปกติอย่างอื่น

3. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EA และปริมาณ Hb E 25-35% แปลผลเป็น Hb E trait โดยทั่วไปผู้ที่เป็นพาหะ Hb E จะมีค่า MCV ประมาณ 75-85 fL หากทำการตรวจคัดกรองด้วย OF Test สามารถให้ผลได้ทั้งบวกและลบ แต่ผลการตรวจคัดกรองด้วย DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography จะให้ผลบวก

4. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น EA และปริมาณ Hb E $< 25\%$ แปลผลเป็น Hb E trait with or without α -thalassemia โดยทั่วไปผู้ที่เป็นพาหะ Hb E ร่วมกับพาหะ α -thalassemia 1 พบ Hb E ประมาณ 19-21% MCV ประมาณ 60-75 fL ผลการตรวจคัดกรองด้วย OF Test และ DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography เป็นบวกทั้งคู่ แต่หากตัวอย่างมีปริมาณ Hb E ต่ำมาก เช่น น้อยกว่า 15% อาจให้ผลลบกับการตรวจคัดกรอง Hb E DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography ได้ซึ่งมักพบว่าผู้ป่วยเป็น EA Bart's disease ที่ไม่ได้รายงาน Hb Bart's (Hb E trait ร่วมกับ Hb H disease)

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 เนื่องจากผู้ที่เป็น 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 จำนวนมากหากทำการตรวจคัดกรองด้วย DCIP Precipitation Test/ Micro-Column Chromatography จะให้ผลบวก

6. ในกรณีที่มั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ 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 การวินิจฉัยแยกชนิดต้องพิจารณาผลการตรวจอื่นๆ ประกอบด้วย หากเป็น EE คือ Homozygous Hb E จะไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียที่รุนแรง ดังรายละเอียดในข้อ 5 แต่ถ้าเป็น EF ก็จะเป็นโรค β -thalassemia/ Hb E ซึ่งผลการตรวจทางโลหิตวิทยาจะพบความรุนแรงมากกว่า ดังรายละเอียดในข้อ 12

หมายเหตุ

1. ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell Morphology) อาจสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Homozygous Hb E และโรค β -thalassemia/ Hb E ทำให้การตรวจวินิจฉัยมีความแม่นยำมากขึ้นโดยลักษณะรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงใน Homozygous Hb E จะพบขนาดของเม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก (Microcytic cell), Target cell และพบ Hypochromic cell ได้บ้าง ในขณะที่ลักษณะรูปร่างเซลล์เม็ดเลือดแดงของโรค β -thalassemia/ Hb E จะพบ Microcytic cell, Target cell, Hypochromic cell, Anisocytosis และ Poikilocytosis จำนวนมาก หากมีผลการตรวจ RBC morphology ของตัวอย่างเลือดใหม่ที่เจาะไม่เกิน 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาใช้แปลผลร่วมกับผลตรวจ CBC และ Hb typing จะทำให้ผลการตรวจวินิจฉัยโรคมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

2. สำหรับการตรวจ Hb typing ด้วยวิธี Capillary Electrophoresis สามารถแยกและรายงาน %Hb A₂

และ %Hb E ออกจากกันได้ ดังนั้น สามารถใช้ค่า EE Score ช่วยวินิจฉัยแยกได้ โดยใช้สูตรคำนวณ

EE Score = $[7.3 (\%A_2) + \%Hb F]$ และแปลผลดังนี้

EE Score ≤ 60 แปลผลเป็น Homozygous Hb E ไม่จำเป็นต้องส่งตรวจ DNA ต่อ

EE Score > 60 แปลผลเป็นมีโอกาสเป็น β -thalassemia/ Hb E ให้ส่งตรวจยืนยัน β -thalassemia mutation ต่อไป

ทั้งนี้จากการศึกษาในหลายแห่งพบว่า EE score ให้ได้ผลดีทั้งในตัวอย่างเลือดผู้ใหญ่และเด็กอายุน้อยกว่า 2 ขวบ

7. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A₂A แปลผลเป็น Suspected Hb Constant Spring อย่างไรก็ตามวิธีฮีโมโกลบินผิดปกตินี้อาจเป็น Hb Paksé ได้เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิดนี้มีจำนวนกรดอะมิโนของสาย α -globin มากกว่าปกติ 31 ตัวเท่ากัน และถึงแม้จะมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 142 ต่างกัน โดยที่ Hb Constant Spring เป็นกลูตามีน (Glutamine: Glu) ส่วน Hb Paksé เป็นไทโรซีน (Tyrosine : Tyr) แต่ประจุสุทธิไม่ต่างกัน จึงตรวจพบในตำแหน่งเดียวกันทั้งการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า และการตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติ HPLC แต่จะรายงานผลจากการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเป็น Hb Constant Spring เนื่องจาก Hb Constant Spring มีความชุกในการตรวจพบมากกว่า Hb Paksé โดยทั่วไปผู้ที่ป่วยจะเป็นพาหะจะไม่ชืดและมีข้อมูลทางโลหิตวิทยาอื่นๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติ

8. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A₂A Bart's แปลผลเป็น Suspected Homozygous Hb Constant Spring ซึ่งผู้ป่วยมักมีภาวะชืดคล้ายผู้ที่ เป็นโรค Hb H อย่างไรก็ตามอาจตรวจไม่พบ Hb Bart's ได้ เนื่องจากสาย γ -globin มีปริมาณน้อย

9. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A_2A H หรือ A_2A Bart's H ปริมาณ Hb A_2 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 จะต้องมียีนน้อยลงมากจึงทำให้สาย β -globin และสาย γ -globin เหลืออยู่มาก จึงจับกันเอง 4 สาย กลายเป็น Hb H และ Hb Bart's ในผู้ป่วยบางรายอาจไม่พบ Hb Bart's เนื่องจากสาย γ -globin มีปริมาณน้อย ผลการตรวจ Blood smear ในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบลักษณะเม็ดเลือดแดงแบบธาลัสซีเมีย แต่มีลักษณะผิดปกติประมาณ 1+ ถึง 2+ ลักษณะจำเพาะที่ใช้วินิจฉัยโรค Hb H ได้ดี คือ การตรวจพบเม็ดเลือดแดงที่มี Inclusion body โดยอาจตรวจพบเม็ดเลือดแดงเช่นนี้ได้ถึง 30-90% ของเม็ดเลือดแดงทั้งหมด

10. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น CS A_2A หรือ CS A_2A Bart's H แปลผลเป็น Hb H-CS disease (α -thalassemia 1/ Hb CS หรือ α -thalassemia 1/ Hb Paksé) อาการต่างๆ จะคล้ายผู้ที่ เป็นโรค Hb H disease (α -thalassemia 1/ α -thalassemia 2) ในข้อ 9 แต่อาการมักจะรุนแรงกว่าเนื่องจากมีความไม่เสถียรของ Hb H ร่วมกับ Hb CS หรือ Hb Paksé และข้อควรระวังสำหรับห้องปฏิบัติการ คือความไม่เสถียรร่วมกับมีปริมาณน้อยของ Hb H และ Hb CS หรือ Hb Paksé หากเก็บเลือดไว้นานเกินไป อาจตรวจไม่พบ ทำให้การแปลผลผิดพลาดได้

11. ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ Hb typing เป็น A_2F ในเด็กอายุมากกว่า 1 ปี ร่วมกับการมีอาการของโรคธาลัสซีเมียชัดเจน ชีต 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 A_2 อาจสูงขึ้นเล็กน้อยหรืออยู่ในเกณฑ์ปกติ ผลการตรวจ Blood smear พบเม็ดเลือดแดงมีลักษณะผิดปกติมากกว่าในโรค Hb H ไม่พบ Hb H Inclusion body ในเม็ดเลือดแดง แต่ผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วอาจจะพบตะกอนของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงได้

ข้อควรระวัง หากพบผลการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเป็น A_2F ต้องตรวจสอบอายุของผู้ป่วยให้ดี ถ้าเป็นเด็กทารกที่อายุยังไม่ถึง 1 ปี จะไม่สามารถวินิจฉัยจिनไทป์ที่แน่นอนได้ เนื่องจากปริมาณ Hb F ยังคงสูงอยู่ต้องรอให้ Hb F ค่อยๆ ลดลงจนอายุมากกว่า 1 ปี จึงสามารถแปลผลการตรวจ Hb typing ได้

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

12.1 กรณีที่เป็นผู้ป่วย β^0 -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia ผู้ป่วยมีอาการของโรคธาลัสซีเมียชัดเจน ชีต ตับม้ามโต คล้าย Homozygous β^0 -thalassemia หรืออาจน้อยกว่า โดยทั่วไปผู้ป่วยกลุ่มนี้มีปริมาณ Hb 4-10 g/dL MCV ประมาณ 55-75 fL ผลการตรวจ Blood smear พบเม็ดเลือดแดงที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและรูปร่าง อาจพบเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (Nucleated red cell) ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการให้เลือดมาแล้ว 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

เนื่องจากการตรวจ 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 A₂FA โดยปริมาณ Hb F 10-30% พบได้ในหลายกรณีดังนี้

13.1 ในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะซีดไม่มีประวัติการรับเลือดภายใน 3 เดือน ก่อนทำการตรวจเลือดควรแปลผลเป็น Suspected β^0 -thalassemia/ β^+ -thalassemia หรือ β^+ -thalassemia/ β^+ -thalassemia

13.2 ถ้าไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมียเลย ก็อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างเลือดรายนั้นเป็นพาหะ 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 และพาหะ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia ออกจากกันได้ หากผลการตรวจพบ Hb typing A₂FA 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 หากไม่มี

อาการของโรคธาลัสซีเมียเลย ก็อาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยมีภาวะ HPFH หรือ $(\delta\beta)^0$ -thalassemia หรือภาวะที่มี Stress erythropoiesis จากสาเหตุอื่นๆ ที่ทำให้มีภาวะเลือดจาง เช่น การตั้งครรภ์ ภาวะเลือดจากเรื้อรัง มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่การเพิ่มของปริมาณ Hb F ในภาวะที่มี Stress erythropoiesis มักจะเพิ่มขึ้นไม่เกินร้อยละ 10 ดังนั้นการที่ตรวจพบปริมาณ Hb F สูงขึ้น แล้วจะสรุปว่าเป็นโรค β -thalassemia จึงต้องพิจารณาให้รอบคอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องทราบประวัติ และอาการของคนไข้ หากมีผลการตรวจเลือดของครอบครัวประกอบด้วยจะช่วยให้วินิจฉัยได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

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 สามารถจับกับสาย β -globin ปกติมากกว่าสาย β^E -globin ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็น Hb E trait จึงตรวจพบปริมาณของ Hb E ลดลงด้วยเสมอเมื่อเทียบกับปริมาณของ Hb A โดยจะพบปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 20 แต่การจะสรุปจีโนไทป์ให้ถูกต้องจริงๆ ควรจะต้องทำการตรวจวิเคราะห์ DNA ทั้งยีน α -thalassemia และ β -thalassemia ด้วย จึงจะสามารถสรุปเพื่อให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ของครอบครัวผู้ป่วยได้อย่างถูกต้อง

16. ในกรณีพบฮีโมโกลบินผิดปกติที่นอกเหนือจาก Hb E และ Hb CS จัดเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบไม่บ่อย (Rare Abnormal Hb) เช่น Hb J Bangkok, Hb Hope, Hb Q-Thailand, Hb C, Hb O และอื่นๆ ควรรายงานตำแหน่งของฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบนโครมาโตแกรมหรือ Electropherogram และแปลผลเป็น suspected abnormal Hb ไม่ควรระบุชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติ ถึงแม้ว่าเครื่องจะรายงาน Window ของฮีโมโกลบินเหล่านั้นก็ตาม เนื่องจากฮีโมโกลบินผิดปกติหลายชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากกัน โดยการตรวจ Hb typing ไม่ว่าจะโดยเครื่อง HPLC 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

17. เนื่องจากมีรายงานตรวจพบ Hb A₂ variant ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีน δ -globin ได้บ่อยขึ้นในคนไทย แม้ว่าความผิดปกติดังกล่าวจะไม่ก่อให้เกิดอาการทางคลินิก แต่อาจทำให้มีปริมาณ Hb A₂ ในผู้ป่วยลดลง และส่งผลทำให้การวินิจฉัยภาวะ β -thalassemia ผิดพลาดได้จากการศึกษาในคนไทยพบว่าความผิดปกติของยีน δ -globin อาจแสดงออกได้ 2 แบบ คือ Hb A₂ variant และ δ -thalassemia ตัวอย่างของ Hb A₂ variants ที่มีรายงานแล้วในคนไทย ได้แก่ Hb A₂-Melborne (HBD:c.130G>A), Hb A₂' (HBD:c.49G>C), Hb A₂-Lampang (HBD:c.142G>A), Hb A₂-Mae Phrik (HBD:c.158A>G), Hb A₂-Indonesia (HBD:c.208G>C), Hb A₂-Kiriwong (HBD:c.233A>G), Hb A₂-Walsgrave (HBD:c.157G>C), Hb A₂-Troodos (HBD:c.349C>T), Hb E-A₂-Troodos (HBD:c.349C>T;HBB:c.79G>A), Hb A₂-Roi-Et (HBD:c.

[249G>T;400G>A]) เป็นต้น โดย Hb A₂ variants เหล่านี้ ตรวจพบเป็นอนุพันธ์ของ Hb A₂ (Hb A₂ derivative) หรือ HbA₂' ($\alpha_2\delta^x_2$) แยกออกจาก peak ของ Hb A₂ ปกติ บน Hb typing ดังนั้นเพื่อป้องกันการวินิจฉัยภาวะ β -thalassemia ผิดพลาด ในการรายงานปริมาณของ Hb A₂ จึงต้องรวม % Hb A₂ ปกติ กับ % Hb A₂ variant เข้าด้วยกัน หากมีปริมาณรวมมากกว่า 3.5 % อาจเป็นภาวะ β -thalassemia ได้

สำหรับ δ -thalassemia ที่มีรายงานตรวจพบในคนไทยมีหลายชนิดเช่นกัน ได้แก่ $\delta^{-77(T>C)}$ (HBD:c.-127T>C), $\delta^{-68(C>T)}$ (HBD:c.-118C>T), $\delta^{-44(G>A)}$ (HBD:c.-94G>A), $\delta^{CD30(A>G)}$ (HBD:c.91A>G), และ $\delta^{IVSII-897(A>C)}$ (HBD:c.316-2A>C) เป็นต้น ซึ่งหากพบร่วมกับภาวะ β -thalassemia อาจทำให้ % Hb A₂ ลดต่ำกว่าที่ควรจะเป็นและทำให้พลาดการวินิจฉัยภาวะ β -thalassemia ได้ แต่เนื่องจาก δ -thalassemia ตรวจพบได้ยากจากการทำ Hb typing หากมีรายที่สงสัย δ -thalassemia เช่น Hb type A₂A ปริมาณ Hb A₂ ปกติ MCV ต่ำกว่า 80 fL ไม่ซีด ตรวจยีน α -thalassemia ให้ผลลบทุกชนิด หากสามีหรือภรรยา มี Hb E และ/ หรือ β -thalassemia อาจต้องพิจารณาตรวจหา ยีน β -thalassemia และ δ -thalassemia เพื่อการให้คำแนะนำปรึกษาถึงความเสี่ยงของทารกในครรภ์อย่างครบถ้วนด้วย

ที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นแนวทางในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียที่พบบ่อยในประเทศไทยซึ่งต้องอาศัยข้อมูลหลายอย่างประกอบ ตั้งแต่ผลการตรวจคัดกรองค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ผล Hb typing ปริมาณ Hb A₂ ปริมาณ Hb F นอกจากนี้ประวัติผู้ป่วยและครอบครัวตลอดจนผลการตรวจเลือดของครอบครัวก็มีส่วนช่วยให้การวินิจฉัยมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

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)

ข้อจำกัด

1. เครื่องวิเคราะห์ฮีโมโกลบินอัตโนมัติแสดงผลในลักษณะโครมาโตแกรมหรือโซนต่าง ๆ ที่ปรากฏร่วมกับปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิดโดยไม่ได้สรุปผล Hb typing ให้ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องมีความรู้และประสบการณ์สูงในการรายงานผลและแปลผล

2. อนุพันธ์ของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin derivatives) เช่น Glycosylated Hb, Acetylated Hb F และฮีโมโกลบิน ที่ไม่เสถียรบางส่วน (Degradation) เนื่องจากเลือดเก่าอาจทำให้เกิดปัญหาการเคลื่อนของค่า retention time และสับสนในการอ่านผลได้

3. ในกรณีที่พบปริมาณ Hb F สูงกว่าปกติ ถ้าไม่ใช่เลือดเด็กแรกเกิด ควรย้อม F Cell ประกอบ

การรายงานผลด้วย เนื่องจากมี Abnormal Hb บางชนิดปรากฏในตำแหน่งเดียวกับ Hb F

4. ในกรณีที่ไม่แน่ใจว่าเป็น Hb H หรือไม่ การย้อม Hb H inclusion bodies จะช่วยยืนยันการรายงานผลได้

5. ในกรณีที่สงสัยว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติ การตรวจเลือดบุคคลอื่นๆ ในครอบครัว และการตรวจแยกชนิดฮีโมโกลบินด้วยระบบอื่นด้วยอาจจะช่วยยืนยันผลในเบื้องต้นได้ว่ามีฮีโมโกลบินผิดปกติหรือไม่ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถรายงานชนิดของฮีโมโกลบินผิดปกติได้ จนกว่าจะได้ตรวจวิเคราะห์ DNA หรือลำดับกรดอะมิโน

การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ

1. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษาและสอบเทียบครุภัณฑ์เป็นประจำสม่ำเสมอ
2. ควรมีการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ (Internal Quality Control) โดยใช้วัสดุควบคุมคุณภาพที่มีมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ
3. ควรเข้าร่วมกิจกรรมควบคุมคุณภาพโดยหน่วยงานภายนอก (External Quality Assurance หรือ Proficiency Testing Program) เป็นประจำ

4. การรายงานผลแต่ละตัวอย่างควรตรวจสอบความสัมพันธ์กับผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นที่มีด้วยเสมอ

5. ผู้ปฏิบัติงานควรได้รับการฝึกอบรมและตรวจประเมินประสิทธิภาพด้านองค์ความรู้ในการวิเคราะห์และประมวลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นประจำ

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 + Hb A ₂ ≥ 25%*	Hb E trait	negative or positive	positive	< 80 or normal	< 27 or normal	Hb E trait
5.	EA, Hb E + Hb A ₂ < 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 + Hb A ₂ ≥ 80% Hb F ≤ 5%	Homozygous Hb E with or without α-thalassemia	positive	positive	< 80	< 27	Homozygous Hb E with or without α-thalassemia

ลำดับ	ผลการตรวจ Hb typing	การแปลผล	ผลการตรวจคัดกรอง				ชนิดของธาลัสซีเมีย
			OF	DCIP	MCV (fL)	MCH (pg)	
7.	EE/ EF, E + Hb A ₂ > 75% Hb F > 5% กรณีไม่แน่ใจว่า EE หรือ EF เนื่องจาก Hb F สูง	Suspected Homozygous Hb E or β -thalassemia/ Hb E with or without α -thalassemia กรุณาดูอาการทางคลินิก หรือทำ Family Study ประกอบการแปลผล	positive	positive	< 80	< 27	Suspected Homozygous Hb E ไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
							Suspected β -thalassemia/ Hb E มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย
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 + Hb A ₂ 40-80% Hb F 20-60%	Suspected β^0 -thalassemia/ Hb E or HPFH/ Hb E or ($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia/ 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 or ($\delta\beta$) ⁰ -thalassemia / Hb E with or without α -thalassemia ไม่มีอาการของโรคธาลัสซีเมีย หรืออาจมีอาการแต่ไม่รุนแรง

ลำดับ	ผลการตรวจ Hb typing	การแปลผล	ผลการตรวจคัดกรอง				ชนิดของธาลัสซีเมีย
			OF	DCIP	MCV (fL)	MCH (pg)	
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 ไม่มี อาการของโรคธาลัสซีเมีย
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 EA	Hb E trait with Hb Constant Spring	negative or positive	positive	< 80 or normal	< 27 or normal	Hb E trait with Hb Constant Spring
21.	CS EE Bart's หรือ CS EF Bart's	CS EF Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	CS EF Bart's disease
22.	CS EFA Bart's	CS EFA Bart's disease	positive	positive	< 80	< 27	CS EFA Bart's disease
23.	rare abnormal Hb	Suspected abnormal Hb	ขึ้นกับชนิดของ Abnormal Hb ที่พบ				Suspected abnormal Hb

* โดยทั่วไปพาหะ Hb E จะตรวจพบปริมาณ Hb E + Hb A₂ น้อยกว่า Hb A โดยมักจะพบในช่วงไม่เกิน ร้อยละ 40 หากพบมากกว่าร้อยละ 40 อาจเป็น Compound β^+ -thalassemia with Hb E หรือ Abnormal Hb ควรปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ

The background of the entire page is a solid blue color. On the right side, there are several stylized, 3D-rendered red blood cells. They are light blue with a darker blue outline and a bright white highlight, giving them a glossy, realistic appearance. They are scattered across the right half of the image, with some appearing closer and larger than others.

การตรวจวิเคราะห์

ความผิดปกติของยีน
ที่เป็นสาเหตุของ
 α -thalassemia 1

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1



ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ในประชากรไทยมีสาเหตุมาจากการขาดหายไปของยีน α -globin ทั้งสองยีนบนโครโมโซมเดียวกัน จึงไม่สามารถสังเคราะห์สาย α -globin ได้เลย สามี-ภรรยาที่มีความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ทั้งคู่ มีโอกาสถ่ายทอดความผิดปกติร่วมกันไปสู่ลูกทำให้ลูกเป็น Homozygous α -thalassemia 1 (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ทารกจะเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์ ตายคลอด หรือไม่ก็ช่วงโคม่าหลังคลอด ในขณะที่มารดาจะเกิดภาวะแทรกซ้อนของการตั้งครรภ์ มีอาการครรภ์เป็นพิษ มีการคลอดผิดปกติ ตกเลือดหลังคลอด หากอาการรุนแรงมากอาจเสียชีวิตได้

หากห้องปฏิบัติการมีศักยภาพในการตรวจหาความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถูกต้องและรวดเร็ว จะช่วยป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับมารดาที่ตั้งครรภ์บุตรเป็น Hb Bart's hydrops fetalis ได้อย่างทันท่วงที

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ α -thalassemia 1 ที่รายงานในประชากรไทยมี 2 ชนิด คือ ชนิด 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 สามารถตรวจได้โดยเทคนิค PCR ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธี Gap PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ PCR Product โดยการทำให้ 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) ซึ่งเป็นขนาดใหญ่เกินกว่าจะเพิ่มจำนวนได้ในการทำ 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 โดยการทำให้ 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 ที่แตกต่างกัน จึงสามารถติดตามความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ทั้ง 2 ชนิดได้

ตัวอย่างที่ไม่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 ทั้งชนิด SEA และชนิดไทย จะพบเฉพาะการเรืองแสงของสี Fluorescence ของ Normal probe ส่วนตัวอย่างที่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 (SEA) Heterozygote จะพบการเรืองแสงของสี Fluorescence ของ Normal probe และ SEA probe และตัวอย่างที่พบความผิดปกติของ α -thalassemia 1 (THAI) Heterozygote จะพบการเรืองแสงของสี Fluorescence ของ Normal probe และ THAI probe

วิธีการ

ส่วนใหญ่แต่ละหน่วยงานจะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ขึ้นใช้เอง หลักการวิเคราะห์จึงอาจแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณตัวอย่างส่งตรวจ ตลอดจนความพร้อมของบุคลากรและเครื่องมือ สิ่งที่สำคัญคือจะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ก่อนเปิดบริการ เพื่อให้สอดคล้องตามข้อกำหนดในมาตรฐานสากล และมีความมั่นใจในประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์

การรายงานผลในกรณีตรวจวินิจฉัยในบุคคลทั่วไปที่ไม่ใช่การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์มารดา

รายงานผล Negative for α -thalassemia 1 (SEA and THAI deletion) ในกรณีที่ตรวจไม่พบความผิดปกติของยีน α -thalassemia 1 ชนิด SEA และชนิด THAI

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

รายงานผล 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. ควรเข้าร่วมกิจกรรมควบคุมคุณภาพโดยหน่วยงานภายนอก (External Quality Assurance หรือ Proficiency Testing Program) เป็นประจำ

3. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษาและสอบเทียบเครื่องมือที่มีผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ เช่น เครื่อง PCR ปิเปตต์ อัตโนมิติ ตู้เย็น และตู้แช่สำหรับเก็บตัวอย่างและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

4. บุคลากรที่ปฏิบัติหน้าที่ควรได้รับการฝึกอบรมเป็นประจำอย่างต่อเนื่อง



การตรวจวิเคราะห์

ความผิดปกติของยีน
ที่เป็นสาเหตุของ
 β -thalassemia

การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia

ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในประชากรไทยส่วนใหญ่เป็นชนิด point mutation ซึ่งเกิดจากการมีเบสเปลี่ยนแปลงไป (Base substitution) หรือเบสจำนวนน้อยๆ 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 ได้บ้างเรียก β^+ -thalassemia ความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในประชากรไทยมีความหลากหลายมาก ปัจจุบันมีรายงานมากกว่า 30 ชนิด โดยแต่ละภูมิภาคแต่ละชุมชนก็มีความแตกต่างกัน

การตรวจหาความผิดปกติของยีนที่เป็นสาเหตุของ β -thalassemia ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค Allele Specific PCR (ASPCR), เทคนิค Reverse Dot Blot Hybridization (RDB), เทคนิค PCR with High-Resolution Melting Analysis (HRMA) 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 ชนิดนั้นๆ โดยออกแบบให้มีเบสจำเพาะที่ปลายด้าน 3' จากนั้นนำ Primer ทั้งสองชนิด

ไปทำ PCR คู่กับ Primer ปกติอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็น Common primer โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase หรือ DNA polymerase ชนิดที่ไม่มีฤทธิ์ของ 3'-5' exonuclease ภายใต้สภาวะในการทำ PCR ที่เหมาะสม Primer จำเพาะแต่ละชนิดจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน β -globin gene จาก Allele ใด Allele หนึ่ง ที่จำเพาะเท่านั้น จึงสามารถแยก β -globin gene ปกติ และ β -thalassemia ออกจากกันได้โดยตรวจดูชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

ในการทำ ASPCR ตัวอย่างที่ให้ผลลบจะไม่ปรากฏแถบ 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 และสะดวกในการตรวจหาความผิดปกติของยีน 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 ชนิดที่มี

ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่อะมิโน (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 โดยการทำการ Color detection วิธีการดังกล่าวสามารถตรวจหาความผิดปกติของยีน β -thalassemia ได้หลายชนิดจากการทำ Hybridization เพียงครั้งเดียว นับเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว

เทคนิค PCR with High-Resolution Melting Analysis (HRMA)

เทคนิค PCR with High-Resolution Melting Analysis (HRMA) อาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงเฉพาะตัวของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังลดลงจากการแยกตัวระหว่างสียฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent dye) กับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยความแตกต่างของลักษณะการปลดปล่อยสัญญาณฟลูออเรสเซนต์นี้มีลักษณะเฉพาะตัวสำหรับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์แม้เพียงหนึ่งตัว

การตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

วิธีตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ วิธี Chain termination ของ Sanger ซึ่งสามารถพัฒนาใช้ร่วมกับเครื่องมืออัตโนมัติ ทำให้การอ่านและการวิเคราะห์ผลทำสะดวกมากขึ้น อาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR โดย DNA สายใหม่ที่กำลังสร้างขึ้นจะถูกจำกัดความยาวด้วย Dideoxy nucleotide

ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัว คือ ddATP, ddGTP, ddCTP และ ddTTP ที่ติดฉลากด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน เมื่อนำปฏิกิริยาที่ได้ไปทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis จะสามารถแยกชิ้นส่วนของ DNA ที่มีความยาวต่างกัน 1 เบสได้ การทำ Electrophoresis โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งมีอุปกรณ์การอ่าน และการแปลผลข้อมูล 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)]

รายงานผล Positive for compound heterozygous β -thalassemia และระบุชนิดของยีนที่ผิดปกติในกรณีตรวจพบความผิดปกติของยีน 2 ชนิดร่วมกัน เช่น Positive for Compound Heterozygous β -thalassemia [Codons 41/42 (-TTCT) and IVS I-5 (G > C)]

ชนิดการกลายพันธุ์ของ β -thalassemia ในคนไทย

No.	Mutations	HGVS name	Type	Mechanism
1	-28 (A>G)	HBB:c.-78A>G	β^+	Transcriptional mutations
2	-30 (T>C)	HBB:c.-80T>C		
3	-31 (A>G)	HBB:c.-81A>G		
4	-50 (G>A)	HBB:c.-100G>A		
5	-86 (C>G)	HBB:c.-136C>G		
6	-87 (C>A)	HBB:c.-137C>A		
7	-90 (C>T)	HBB:c.-140C>T		
8	+1 (A>C)	HBB:c.-50A>C	β^+	Cap site mutation
9	Init. Codon (ATG>AGG)	HBB:c.2T>G	β^0	Initiation codon mutation
10	Codon 8/9 (+G)	HBB:c.27dupG	β^0	Frameshift mutations
11	Codon 14/15 (+G)	HBB:c.45dupG		
12	Codon 15 (-T)	HBB:c.46delT		
13	Codon 27/28 (+C)	HBB:c.85dupC		
14	Codon 33/34 (-G)	HBB:c.102_103delG		
15	Codon 41 (-C)	HBB:c.126delC		
16	Codon 41/42 (-TTCT)	HBB:c.126_129delCTTT		
17	Codon 71/72 (+T)	HBB:c.216dupT		
18	Codon 71/72 (+A)	HBB:c.217dupA		
19	Codon 95 (+A)	HBB:c.287dupA		
20	Codon 121 (-G)	HBB:c.364delG		
21	Codon 123-125 (-ACCCCACC) (Hb Khonkaen)	HBB:c.370_378delACCCCACCA		
22	Codon 30 (AGG>ACG) or IVS I-1	HBB:c.92G>C	β^0	RNA processing mutations
23	IVS I-1 (G>T)	HBB:c.92+1G>T	β^0	
24	IVS I-1 (G>A)	HBB:c.92+1G>A	β^0	
25	IVS I-2 (T>C)	HBB:c.92+2T>C	β^0	
26	IVS I-2 (T>A)	HBB:c.92+2T>A	β^0	
27	IVS I-5 (G>C)	HBB:c.92+5G>C	β^+ (severe)	
28	IVS I-116 (T>G)	HBB:c.93-15T>G	β^0	
29	IVS II-654 (C>T)	HBB:c.316-197C>T	β^+ (severe)	RNA processing mutations
30	IVSII-815 (C>T)	HBB:c.316-36C>T	Unclear	
31	Codon 19 (AAC>AGC)	HBB:c.59A>G	β^+ (Hb Malay)	
32	Codon 26 (GAG>AAG)	HBB:c.79G>A	β^+ (Hb E)	
33	CD 26 (GAG>AAG), IVS I-7 (A>G) (Hb E-Udon Thani)	HBB:c.[79G>A;92+7A>G]	β^+	
34	CD 26 (GAG>AAG), IVS I-7 (A>T)	HBB:c.[79G>A;92+7A>T]	β^+	

No.	Mutations	HGVS name	Type	Mechanism
35	Codon 126 (GTG>GGG)	HBB:c.380T>G	β ⁺ (Hb Dhonburi or Hb Neapolis)	Unstable Hb
36	Codon 15 (TGG>TAG)	HBB:c.47G>A	β ⁰	Nonfunctional mRNA mutations (nonsense mutations)
37	Codon 17 (AAG>TAG)	HBB:c.52A>T		
38	Codon 26 (GAG>TAG)	HBB:c.79G>T		
39	Codon 35 (TAC>TAA)	HBB:c.108C>A		
40	Codon 43 (GAG>TAG)	HBB:c.130G>T		
41	PolyA (AATAAA>AATAGA)	HBB:c.*112A>G	β ⁺	Polyadenylation mutation
42	β ⁰ -thalassemia (105 bp deletion)	HBB:c.-74_31del	β ⁰	Gene deletions
43	β ⁰ -thalassemia (619 bp Asian Indian deletion)	NG_000007.3:g.71609_72227del		
44	Thai β ⁰ -thalassemia (3485 bp deletion)	NC_000011.10:g.5224302_5227791del		
45	Prachinburi β ⁰ -thalassemia (60 kb deletion)	NC_000011.10:g.5167971_5228123del		
46	Filipino β ⁰ -thalassemia (118.5 kb deletion)	NC_000011.10:g.5112882_5231358del		
47	Thai/Vietnamese/Laotian δβ ⁰ -thalassemia (12.6 kb deletion)	NG_000007.3:g.64383_76994del	δβ ⁰	
48	Thai δβ ⁰ -thalassemia (11.3 kb deletion)	NG_000007.3:g.60045_71313del		
49	Indian deletion-inversion ^G γ(^A γδβ) ⁰ -thalassemia	NG_000007.3:g.48400_49245del;49246_64567inv;64568_72051del	^A γδβ ⁰	
50	Chinese ^A γδβ ⁰ -thalassemia (78.9 kb deletion)	NG_000007.3:g.48795_127698del		
51	Siriraj ^A γδβ ⁰ -thalassemia (~118 kb deletion)	AC104389.8:g.52507_165744del		
52	Thai deletion-inversion-insertion ^A γδβ ⁰ -thalassemia (118.3 kb deletion)	NG_000007.3:g.47449_165744del	^A γδβ ⁰	Gene deletions
53	HPFH-6 (79.3 kb deletion)	NG_000007.3:g.45595_124872del	HPFH	
54	Vietnamese/ SEA HPFH (27 kb deletion)	NG_000007.3:g.64384_76993del		
55	Hb Lepore	NG_000007.3:g.63290_70702del, NG_000007.3:g.63632_71046del	δβ ⁺	

การควบคุมคุณภาพ

1. ควรทำ Positive control และ Negative control โดยใช้ตัวอย่าง DNA ที่ผ่านการตรวจยืนยันแล้ว ทำปฏิกิริยาควบคู่ไปกับตัวอย่างส่งตรวจทุกครั้ง
2. ควรเข้าร่วมกิจกรรมควบคุมคุณภาพโดย

หน่วยงานภายนอก (External Quality Assurance หรือ Proficiency Testing Program) เป็นประจำ

3. ควรให้ความสำคัญในการดูแลบำรุงรักษา และสอบเทียบครุภัณฑ์ที่มีผลกระทบต่อความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์

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 จะใช้ในกรณีที่ทำการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างทารกที่มีพ่อและแม่มี Mutation ชนิดเดียวกัน แต่ถ้าพ่อและแม่มี Mutation ต่างชนิดกัน เช่น พ่อมี β -thalassemia Codon 17 [A > T] แม่มี Hb E ตัวอย่าง DNA ของทารกก็จะตรวจด้วย Primer M ของ Codon 17 [A > T] และ Hb E เท่านั้น ส่วนการตรวจหา Mutation ของยีน β -thalassemia ในหญิงตั้งครรภ์ และหรือคู่สมรส ที่มีผลการตรวจคัดกรองเป็นบวก และผลวิเคราะห์ฮีโมโกลบินที่วินิจฉัยได้แล้วว่าเป็นพาหะ β -thalassemia (Hb typing A_2A with high Hb A_2) เมื่อให้ผลบวกกับ Mutation ใดแล้วก็ไม่จำเป็นต้องตรวจกับ Primer N ต่อ

2. จำเป็นต้องใช้ Primer หลายชนิดในการตรวจ แต่ถ้าเลือกศึกษาในกลุ่มประชากรเป้าหมายแล้วจะมี Mutation ที่ต้องตรวจไม่มากนัก

เทคนิค Reverse Dot Blot Hybridization (RDB)

1. กรณีที่เป็น Compound Heterozygote ของ Mutation ที่มีตำแหน่งใกล้กัน เช่น IVS 1-1 และ IVS 1-5 หรือ Codon 17 และ Codon 19 จะไม่พบการเกิดสปีน Normal probe เนื่องจากตำแหน่งที่ผิดปกติใกล้กัน ทำให้ Normal probe ทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถ Hybridize กับ DNA template ได้

2. เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน จึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์สูง

เทคนิค PCR with High-Resolution Melting Analysis (HRMA)

1. ต้องทดสอบ DNA Positive control ร่วมด้วยทุกครั้ง เพื่อใช้เป็นกราฟอ้างอิงสำหรับแปลผลการตรวจวิเคราะห์

2. กรณีที่ Mutation ต่างชนิดกันแต่ให้ลักษณะกราฟที่คล้ายคลึงกันมาก หากไม่ซ้อนทับกับกราฟอ้างอิงอาจจำเป็นต้องทำการตรวจยืนยันชนิด Mutation ด้วยเทคนิคอื่น

3. หากพบ Single Nucleotide Polymorphism ร่วมกับ Mutation มีผลทำให้ลักษณะของกราฟคลาดเคลื่อนไม่ตรงกับกราฟ DNA Positive control ต้องทำการตรวจยืนยันชนิด Mutation ด้วยเทคนิคอื่น

การตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (DNA sequencing)

1. นิยมใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด Point mutation หรือเบสจำนวนน้อยๆ ขาดหายไป หรือเกินมา (Small deletion หรือ Insertion) กรณีที่เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการขาดหายไปของยีน (Deletion) ขนาดใหญ่ ซึ่งอยู่นอกเหนือจากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยลักษณะการกลายพันธุ์ดังกล่าวได้ จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคอื่นเพื่อตรวจหายีนที่ผิดปกติต่อไป เช่น Thai β^0 -thalassemia (3,485 bp deletion)

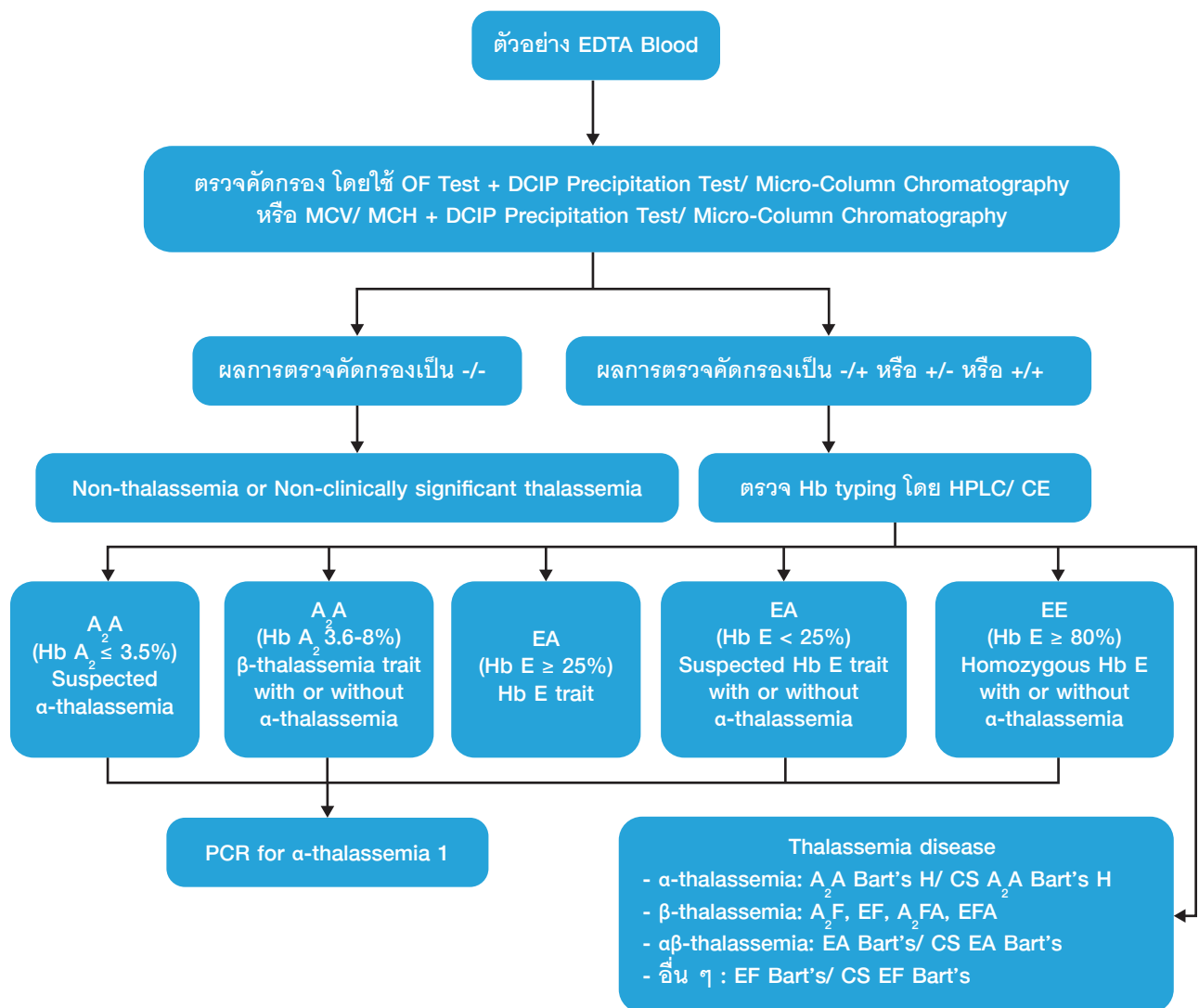
2. เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน จึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญและมีประสบการณ์สูง

3. เป็นวิธีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการอ้างอิงที่ให้บริการตรวจหาลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมในด้านอื่นที่นอกเหนือจากการตรวจหาความผิดปกติของยีนธาลัสซีเมีย

สรุปแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ
และตารางแสดงชนิด**ธาลัสซีเมีย**
ของคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตร
เป็น**โรคธาลัสซีเมีย**ชนิดรุนแรง

สรุปแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ และตารางแสดงชนิดรหัสซีเมียของคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

ภาพสรุปแนวทางการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ



ชนิดธาลัสซีเมียของคู่สามีภรรยาที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

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

หมายเหตุ

1. β -thal/ Hb E และ Homo β -thal บางรายตั้งครรภ์ได้เมื่อได้รับการรักษามาอย่างดี
2. ในกรณีที่คู่สามีภรรยามียีน β -thal หรือ Hb E ควรต้องพิจารณาการมียีนแฝง α -thal 1

ในตัวอย่างดังกล่าวจากผลการตรวจคัดกรองและผลการทำ Hb typing ด้วยและต้องประเมินโอกาสที่ทารกในครรภ์จะเป็นโรค Hb Bart's hydrops fetalis ร่วมด้วยเสมอ



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. กุลนภา พู่เจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2549.
2. กุลนภา พู่เจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.
3. กุลนภา พู่เจริญ, สุพรรณ พู่เจริญ. การตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียในประเทศไทย. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด; 2551. 165-176.
4. จิว เขียวถาวร, สุทัศน์ พู่เจริญ, จินตนา พัฒนพงศ์ธร. ธาลัสซีเมีย คู่มือการวินิจฉัยและแนะนำปรึกษา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2542.
5. ชญา ศาสตร์สุข. การประยุกต์ใช้ EE Score เพื่อวินิจฉัยแยกชนิดระหว่าง homozygous Hb E และ β -thalassemia/Hb E. การประชุมวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 24 ณ ทึก การ์เด็น สปา รีสอร์ท จ.เชียงใหม่ 21-23 สิงหาคม 2562.
6. ปราณิ (วินิจจะกุล) พู่เจริญ, สุทัศน์ พู่เจริญ (บรรณาธิการ). ธาลัสซีเมีย การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล; 2541.
7. ปราณิ (วินิจจะกุล) พู่เจริญ. Laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies. การประชุมเชิงปฏิบัติการ (Workshop) Thalassemia: from molecular biology to clinical medicine. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล, 9-20 มีนาคม 2541.
8. รวิวรรณ พวงพฤษ, ยุพิน ใจแปง, ปรีพัศ เนตรนิ, ธิดาอุมา เอื้องคำประเสริฐ. การประเมินประสิทธิภาพของ EE score ในการแยก homozygous Hb E และ β^0 -thalassemia/Hb E. วารสารเทคนิคการแพทย์. 2564;7832-7844.
9. วิชัย เหล่าสมบัติ. ธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์, 2541. 71-124.

10. สาคร วันทอง, กุลนภา ฟูเจริญ, เชี่ยวชาญ สระคูพันธ์, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, ณัฐยา แซ่อึ้ง, สุพรรณ ฟูเจริญ. การจัดตั้งระบบควบคุมคุณภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจคัดกรองธาลัสซีเมียที่โรงพยาบาลเมืองสรวง จังหวัดร้อยเอ็ด. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด: 2550. 148-166.

11. สิริภากร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคทางพันธุกรรม พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์: 2548.

12. สุทัศน์ ฟูเจริญ, วรวรรณ ต้นไพจิตร, กิตติ ต่อจรัส, วิพร วิประกษิต, อรุณทัย มีแก้วบุญชร (บรรณาธิการ). แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี; 2557.

13. สุพรรณ ฟูเจริญ, กุลนภา ฟูเจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียตามแผนงานการควบคุมและป้องกันโรคของประเทศไทย. สงขลานครินทร์เวชสาร; 2545;20:43-55.

14. Arong A, Wangwok G, Singha K, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Differentiation of homozygous hemoglobin E and hemoglobin E- β^0 -thalassemia in children. Int J Lab Hematol. 2019;41:e70-e72.

15. Chaibunruang A, Fucharoen G, Fucharoen S. First description of a Hb A2 variant in Thailand. Identification of Hb A2-Melbourne [δ 43(CD2)Glu-Lys] in Thai individuals. Hemoglobin. 2012;36:80-4.

16. Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Saeung 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.

17. Hanart C, Singha K, Changtrakul Y, Fucharoen S, Srivorakun H. Prospective screening for δ -hemoglobinopathies associated with decreased hemoglobin A2 levels or hemoglobin A2 variants: A single center experience. Clin Chim Acta. 2023;547:117417.

18. Panyasai S, Fucharoen G, Fucharoen S. Known and new hemoglobin A2 variants in Thailand and implication for β -thalassemia screening. Clin Chim Acta. 2015;438:226-30.

19. Phasit A, Panyasai S, Mayoon M, Jettawan N, Satthakarn S. Phenotypic expression of known and novel hemoglobin A2-variants, hemoglobin A2-Mae Phrik [Δ 52(D3) Asp >Gly, HBD:c.158A > G], associated with hemoglobin E [β 26(B8) Glu > Lys, HBB:c.79G > A] in Thailand. Genes (Basel). 2022;13:959.

20. Prajantasen T, Prayalaw P, Panyasai S, Binlee S, Nongnuan S. Development of a high resolution melting curve analysis for the detection of hemoglobin δ -chain variants in Thailand and identification of Hb A2-Walsgrave [codon 52 (GAT>CAT), Asp-His; HBD:c.157G>C] in a pregnant woman from southern Thailand. *Genet Test Mol Biomark*. 2021;25:426-433.
21. Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Sae-ung N, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. Molecular and hematologic features of hemoglobin E heterozygotes with different forms of alpha-thalassemia in Thailand. *Ann Hematol*. 2003;82(10):612-6.
22. 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.
23. Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. EE score: an index for simple differentiation of homozygous Hb E and hemoglobin E- β -thalassemia. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56:1507-1513.
24. Singha K, Fucharoen G, Fucharoen S. δ -Hemoglobinopathies in Thailand: screening, molecular basis, genotype-phenotype interaction, and implication for prevention and control of thalassemia. *Ann Hematol*. 2021;100:1953-63.
25. Singha K, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Fucharoen S. Genetic and non-genetic factors affecting hemoglobin A2 expression in a large cohort of Thai individuals: implication for population screening for thalassemia. *Am J Transl Res*. 2021;13(10):11632-11642.
26. Srivorakun H, Thawinan W, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Thalassemia and erythroid transcription factor KLF1 mutations associated with borderline hemoglobin A2 in Thai population. *Arch Med Sci*. 2022;18(1):112-120.
27. Weatherall DJ, Clegg JB. The laboratory diagnosis of the thalassemias. In: The thalassemia syndromes. 4th ed. Blackwell Scientific Publication: Oxford; 2001.
28. Wong P, Sritippayawan S, Suwannakhon N, Tapprom A, Deoisares R, Sanguansermisri T. Q Sepharose micro-column chromatography: a simple screening method for identifying beta thalassemia traits and hemoglobin E carriers. *Clin Biochem*. 2016;49(16-17):1288-91.

คำสั่ง

คณะกรรมการ และ คณะทำงาน

คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ที่ ๒๓๕๖/๒๕๖๖
เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ
“คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ
ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖”

ตามคำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ ๖๘๐/๒๕๕๘ ลงวันที่ ๒๗ เมษายน ๒๕๕๘ ได้แต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ให้จัดทำคู่มือฯ ฉบับปรับปรุงปี พ.ศ. ๒๕๕๘ สำหรับใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติงานให้มีมาตรฐานเดียวกัน เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานด้านการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ในการพัฒนาเครือข่ายการตรวจโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ นั้น

เพื่อให้การจัดทำคู่มือดังกล่าวทันสมัย สอดคล้องกับเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบัน ฉะนั้นอาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๓๒ แห่งพระราชบัญญัติระเบียบบริหารราชการแผ่นดิน พ.ศ. ๒๕๓๔ และที่แก้ไขเพิ่มเติม อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงมีคำสั่งดังนี้

๑. ให้ยกเลิกคำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ ๖๘๐/๒๕๕๘ ลงวันที่ ๒๗ เมษายน ๒๕๕๘ เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

๒. แต่งตั้งคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” โดยมีองค์ประกอบ หน้าที่และอำนาจดังนี้

๒.๑ องค์ประกอบ

- | | |
|---|-----------|
| (๑) อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | ที่ปรึกษา |
| (๒) ศาสตราจารย์เกียรติคุณ คุณหญิงสุดศราคร ตั้งจิณดา
ประธานมูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย | ที่ปรึกษา |
| (๓) ศาสตราจารย์เกียรติคุณ วรพรรณ ต้นไฉจิตร
มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทย | ที่ปรึกษา |
| (๔) รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้รับมอบหมาย | ประธาน |
| (๕) ศาสตราจารย์สุพรรณ พุ้เจริญ
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น | กรรมการ |
| (๖) รองศาสตราจารย์ พันเอกกิตติ ต่อจรัส
โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า | กรรมการ |
| (๗) รองศาสตราจารย์ชนนทร์ วนาภิรักษ์
ราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย | กรรมการ |
| (๘) รองศาสตราจารย์พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ | กรรมการ |
| (๙) รองศาสตราจารย์พีระพล ว่อง
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร | กรรมการ |
| (๑๐) ผู้ช่วยศาสตราจารย์วณิชชา เทพชาพันธ์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | กรรมการ |
| (๑๑) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ทิพรรัตน์ เพ็งหลัง คงแก้ว
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | กรรมการ |

(๑๒) นางสาวสิริภากร แสงกิจพร สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๑๓) ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๑๔) นางปราณี พู่เจริญ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล	กรรมการ
(๑๕) นายชนินทร์ ลิ้มวงศ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	กรรมการ
(๑๖) นางสาวภิญญาพัชญ์ คำพิคำ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	กรรมการ
(๑๗) นายกฤษดา สิงหะ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	กรรมการ
(๑๘) นายคณิตศักดิ์ จันทราพิพัฒน์ สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ	กรรมการ
(๑๙) นางสาวกุลภัสสรณ์ แสงสีเขียว โรงพยาบาลราชวิถี	กรรมการ
(๒๐) นายโอฬาริก มุสิกวงศ์ กรมอนามัย	กรรมการ
(๒๑) นางสาวฉวีวรรณ ต้นพุดชา กรมอนามัย	กรรมการ
(๒๒) นางสาวอัมรา โยวัง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑/๑ เชียงราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๓) นางปานทิพย์ ศิริโชติ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๕ สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๔) นางสาวรดา เตร์ยาชิงห์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๖ ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๕) นางขวัญใจ วังคะฮาด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๐ อุบลราชธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๖) นางพัทธนันท์ ธนพัตสิริกุล ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ๑๑ สุราษฎร์ธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๗) นางสาวอรพรรณ ศรีพิชัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการ
(๒๘) นายเกรียงศักดิ์ ฤชุศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	กรรมการและเลขานุการ

- (๒๙) นางสาวสาวิตรี ด้วงเรือง
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- (๓๐) นางสาวปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- (๓๑) นางสาวสุนิสา ศรีสวัสดิ์
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

๒ ๒. หน้าที่และอำนาจ

- (๑) ทบทวนปัญหา อุปสรรคในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ
- (๒) ดำเนินการจัดประชุมเพื่อทบทวนเนื้อหาในคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการให้มีความถูกต้อง ทันสมัยและเป็นปัจจุบัน
- (๓) แต่งตั้งคณะอนุกรรมการ หรือคณะทำงานเพื่อปฏิบัติงานได้ตามความจำเป็นและเหมาะสม
- (๔) รวบรวมต้นฉบับ พิสูจน์อักษร จัดทำรูปเล่มต้นฉบับและหน้าปกคู่มือ
- (๕) ติดต่อประสานงานโรงพิมพ์ เพื่อจัดพิมพ์และแจกจ่ายคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖
- (๖) ปฏิบัติงานอื่น ๆ ตามที่อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๒๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๖๖



(นายศุภกิจ ศิริลักษณ์)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำสั่งคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ
“คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ
ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖”
ที่ ๐๑/๒๕๖๖
เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานทบทวนและจัดทำ
“คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ
ทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖”

ตามคำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ ๒๓๕๖/๒๕๖๖ ลงวันที่ ๒๑ กรกฎาคม ๒๕๖๖ เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” นั้น

เพื่อให้การจัดทำคู่มือดังกล่าวทันสมัย สอดคล้องกับเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พัฒนาขึ้นในยุคปัจจุบัน เป็นไปด้วยความเรียบร้อย มีประสิทธิภาพ ฉะนั้นอาศัยอำนาจในข้อ ๒.๒ (๓) ของคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” ภายใต้คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ ๒๓๕๖/๒๕๖๖ ลงวันที่ ๒๑ กรกฎาคม ๒๕๖๖ ประธานคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” จึงมีคำสั่งแต่งตั้งคณะทำงานทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” โดยมีองค์ประกอบ หน้าที่และอำนาจ ดังนี้

๑. องค์ประกอบ

- | | |
|---|----------------|
| ๑.๑ ศาสตราจารย์สุทัศน์ ฟูเจริญ | ที่ปรึกษา |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๒ ศาสตราจารย์สุพรรณ ฟูเจริญ | ที่ปรึกษา |
| คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น | |
| ๑.๓ รองศาสตราจารย์กุลณา ฟูเจริญ | ที่ปรึกษา |
| คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น | |
| ๑.๔ นางปราณี ฟูเจริญ | ที่ปรึกษา |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๕ นางสิริภากร แสงกิจพร | ประธานคณะทำงาน |
| สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | |
| ๑.๖ รองศาสตราจารย์ หม่อมหลวงเสาวรส สวัสดิวัฒน์ | คณะทำงาน |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๗ นายกิตติพงศ์ ไพบูลย์สุขวงศ์ | คณะทำงาน |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๘ นางสาวทองเพิ่ม มั่นคงดี | คณะทำงาน |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๙ นายนที เจียรวิริยะไพศาล | คณะทำงาน |
| สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล | |
| ๑.๑๐ นายสมคิด ธิจักร์ | คณะทำงาน |
| ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑ เชียงใหม่
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | |

๑.๑๑	นางอัษฎิษฐา เรืองวุฒิ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑/๑ เชียงราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๒	นางสาวจุฑา นุญยอด ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๒ พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๓	นางศิริกัญญา เพชรพิชัย ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๓ นครสวรรค์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๔	นายเจตน์ วันแต่ง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๔ สระบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๕	นางปานทิพย์ ศิริโชติ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๕ สมุทรสงคราม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๖	นางสาวรดา เติร์ยาสิงห์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๖ ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๗	นายทนต์ศักดิ์ เศษอ่อน ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๗ ขอนแก่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๘	นางดลนภา ตระกูลทองดี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๘ อุตรธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๑๙	นางสาวกันยรัตน์ แคนตะ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๙ นครราชสีมา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๒๐	นางวิภาวดี เจียรกุล ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๐ อุบลราชธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๒๑	นางพัทธนันท์ ธนพัตสิริกุล ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๑ สุราษฎร์ธานี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๒๒	นางอิริยะพร กองทัพ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๑/๑ ภูเก็ต กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๒๓	นางสาวเบญจพร หนูทอง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๒ สงขลา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน
๑.๒๔	นางสาวจิรวรรณ เตยแก้ว ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ ๑๒/๑ ตรัง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	คณะทำงาน

๑.๒๕ นางสาวอรพรรณ ศรีพิชัย

คณะทำงาน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๒๖ นายเกรียงศักดิ์ ฤทธศาสตร์

คณะทำงานและเลขานุการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๒๗ นางสาวสาวิตรี ด้วงเรือง

คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๒๘ นางสาวปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์

คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๒๙ นางสาวสุนิสา ศรีสวัสดิ์

คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๓๐ นางสาวจุฑาทิพย์ ชันทะมลทล

คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๒. หน้าที่และอำนาจ

๒.๑ ทบทวนปัญหา อุปสรรคในการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ และจัดทำข้อมูลเสนอคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖”

๒.๒ พิสูจน์อักษร จัดทำรูปเล่มต้นฉบับและหน้าและหน้าปกคู่มือ

๒.๓ หน้าที่อื่น ๆ ตามที่คณะกรรมการทบทวนและจัดทำ “คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖” มอบหมาย

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๑๑ กันยายน พ.ศ.๒๕๖๖



(นายบัลลังก์ อุปพงษ์)

รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ประธานคณะกรรมการทบทวนและจัดทำ

“คู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ

ฉบับปรับปรุง ปี พ.ศ. ๒๕๖๖”



คู่มือทางห้องปฏิบัติการ
การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสซิกาและอีโบลา



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
Department of Medical Sciences

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

88/7 ซอยบำรุงราษฎร์ ถนนสุขุมวิท ต.คลองตัน อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000 โทรศัพท์. 0-2589-9850 ถึง 8 โทรสาร. 0-2591-5974 E-Mail : prdmsc@dmsc.mail.go.th