



การพัฒนาการตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเอสอีเอ, ชนิดไทย, และชนิดเชียงรายในงาน

ประจำวัน : งานประจำวันสู่ระดับชาติ

Development of α^0 -thalassemia --^{SEA}, --^{THAI}, and --^{CR} testing in routine diagnosis:

from routine laboratory to national scale

เชษฐภัค เรืองดิษฐ์^{1*} มนุ ปัญญามัง¹ ณัฐจิรา อินตะใส² และ สาคร พรประเสริฐ²

¹หน่วยธาลัสซีเมีย ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*gaouts.sgouty@gmail.com

1.แนวปฏิบัติที่ดีในด้านวิจัย

2.บทนำ/ที่มาและความสำคัญ

การตรวจคัดกรองความเสี่ยงและยืนยันโรคธาลัสซีเมียในพื้นที่ที่มีความชุกของแอลฟาธาลัสซีเมียมีความจำเป็นอย่างมากในการป้องกันและควบคุมโรค โดยกรรมวิธีการตรวจต้องง่าย ไม่ซับซ้อน สะดวก พร้อมทั้งให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจที่สามารถตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียได้หลายชนิด รวมถึงชนิดที่พบบ่อยใหม่ เช่น ชนิดเชียงราย ซึ่งเป็นล้วนเป็นสาเหตุของโรคทารกบวมน้ำชนิดบาร์ทในหลอดปฏิบัติการเดียวกันจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

3.วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเอสอีเอ ชนิดไทย และชนิดเชียงรายด้วยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ร่วมกับอิวากรินและการทำเอซอร์เอ็มอนาไลซิส และพร้อมทั้งนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปค้นหาความชุกของแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเอสอีเอ ชนิดไทย และชนิดเชียงราย

4. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (ถ้ามี)

5. วิธีการ/กระบวนการ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดการกลายพันธุ์ของแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียแล้วมาทดสอบเพื่อพัฒนาชุดตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเอสอีเอ ชนิดไทย และชนิดเชียงรายโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ร่วมกับสีอิวากรีนและการทำเอซอาร์เอ็มอานาไลซิส จากนั้นจึงนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียในงานประจำวัน ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์คลินิก คณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผลจากการทำเอซอาร์เอ็มอานาไลซิสพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงราย ชนิดไทย ชนิดเอสอีเอ และแอลฟาโกลบินไวลไทป์ มีค่าอุณหภูมิคลายตัวเฉลี่ยที่จำเพาะเจาะจงที่ 85.40, 86.50, 87.65 และ 91.04 องศาเซลเซียสตามลำดับ จากการตรวจตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม ปี 2565 ถึงเดือนมกราคม ปี 2567 จำนวนทั้งสิ้น 6,916 ราย พบความถี่ของแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเอสอีเอ ชนิดไทย ชนิดเชียงราย ที่ร้อยละ 13.79, 0.17 และ 0.39 ตามลำดับ

6. ผลกระทบที่เป็นประโยชน์หรือสร้างคุณค่า

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียทั้ง 3 ชนิดในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันสามารถนำไปใช้ป้องกันและควบคุมโรคทารกบวมน้ำชนิดบาร์ทได้ อีกทั้งยังลดค่าใช้จ่าย ลดเวลาการตรวจและเพิ่มการตรวจให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

7. แผนการดำเนินงาน / การนำไปใช้

เนื่องจากการพบพาหะแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงรายมีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีความชุกสูงกว่าชนิดไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคเหนือของประเทศไทย ประกอบกับยังไม่ได้มีนโยบายในการเพิ่มการตรวจและรายงานผลการตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงรายในระบบฐานข้อมูลของประเทศ โอกาสที่จะเกิดโรคทารกบวมน้ำชนิดบาร์ทที่มีสาเหตุจากแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงรายย่อมเกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงเสนอแนะให้มีการบรรจุการตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงรายเข้าไปคู่มือการตรวจธาลัสซีเมียและรายงานผลการตรวจในระบบฐานข้อมูลกลางของประเทศ

8. วิเคราะห์และสรุปสาระสำคัญ

ห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยธาลัสซีเมีย ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์คลินิก คณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นหน่วยบริการแรกในประเทศไทยที่สามารถตรวจแอลฟาคุนยธาลัสซีเมียชนิดเชียงรายได้ และได้เปิดให้บริการตั้งแต่เดือนตุลาคม ปี 2565 ผลงานนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ และได้นำเสนอในงานสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 25 ณ โรงแรมเซ็นทารา ไอล์ ศูนย์ราชการ จัดขึ้นวันที่ 27-29



มีนาคม 2567 โดยได้รับรางวัลชนะเลิศในการนำเสนอผลงานด้วยวาจาและรางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 ในการนำเสนอผลงานด้วยโปสเตอร์ อีกทั้งผลการวิจัยที่ได้ถูกนำเสนอ

9.เอกสารอ้างอิง

1. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*. 1989;73(5):1081-104.
2. Kazazian HH, Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*. 1990;27(3):209-28.
3. Nicholls RD, Fischel-Ghodsian N, Higgs DR. Recombination at the human alpha-globin gene cluster: sequence features and topological constraints. *Cell*. 1987;49(3):369-78.
4. Winichagoon P, Higgs DR, Goodbourn SE, Clegg JB, Weatherall DJ, Wasi P. The molecular basis of alpha-thalassaemia in Thailand. *EMBO j*. 1984;3(8):1813-8.
5. Eng B, Patterson M, Borys S, Chui DH, Waye JS. PCR-based diagnosis of the Filipino (--(FIL)) and Thai (--(THAI)) alpha-thalassemia-1 deletions. *Am J Hematol*. 2000;63(1):54-6.
6. Fischel-Ghodsian N, Vickers MA, Seip M, Winichagoon P, Higgs DR. Characterization of two deletions that remove the entire human zeta-alpha globin gene complex (- -THAI and - -FIL). *Br J Haematol*. 1988;70(2):233-8.
7. Fucharoen G, Fucharoen S, Wanhakit C, Srithong W. Molecular basis of alpha (0)-thalassemia in northeast of Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1995;26 Suppl 1:249-51.
8. Wang Y, Liu C, Zhang L, Du L, Zhou W, Huang S, et al. Identification of a novel 44.6-kb deletion causing alpha(0) -thalassemia in southern China. *Int J Lab Hematol*. 2017;39(4):e94-e7.
9. Ruengdit C, Panyasai S, Kunyanone N, Phornsirichaoenphant W, Ngamphiw C, Tongsimma S, et al. Characterization and identification of Hb Bart's hydrops fetalis caused by a compound heterozygous mutation --(SEA) /--(CR) , a novel alpha(0) -thalassemia deletion. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(3):e116-e20.
10. Ruengdit C, Khamphikham P, Punyamung M, Pongpunyayuen P, Pornprasert S. Diagnosis of alpha(0)-thalassemia Chiang Rai (--(CR)) deletion by melt curve analysis in Northern Thailand. *Scand J Clin Lab Invest*. 2022:1-4.
11. Ruengdit C, Khamphikham P, Jinorose N, Pornprasert S. Hb Bart's hydrops fetalis syndrome and Hb H disease caused by deletional Chiang Rai (- -(CR)) alpha(0)-thalassemia in two unrelated Thai families. *Hemoglobin*. 2021;45(2):75-9.



12. Ko TM, Hsieh FJ, Hsu PM, Lee TY. Molecular characterization of severe alpha-thalassemias causing hydrops fetalis in Taiwan. *Am J Med Genet.* 1991;39(3):317-20.
13. Liang ST, Wong VC, So WW, Ma HK, Chan V, Todd D. Homozygous alpha-thalassaemia: clinical presentation, diagnosis and management. A review of 46 cases. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985;92(7):680-4.
14. Thumasathit B, Nondasuta A, Silpisornkosol S, Lousuebsakul B, Unchalipongse P, Mangkornkanok M. Hydrops fetalis associated with Bart's hemoglobin in northern Thailand. *J Pediatr.* 1968;73(1):132-8.
15. Munkongdee T, Vattanaviboon P, Thummarati P, Sewamart P, Winichagoon P, Fucharoen S, et al. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia by melting curve analysis. *J Mol Diagn.* 2010;12(3):354-8.
16. Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermisri T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol.* 2008;80(6):510-14.
17. Pornprasert S, Sukunthamala K. SYTO9 and SYBR GREEN1 with a high resolution melting analysis for prenatal diagnosis of beta-thalassemia/hemoglobin-E. *Eur J Haematol.* 2010.
18. Prathomtanapong P, Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, Saetung R, Sanguansermisri T. Detection and identification of beta-thalassemia 3.5 kb deletion by SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol.* 2009;82(2):159-60.
19. Varga A, James D. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *J Virol Methods.* 2006;132(1-2):146-53.
20. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol.* 2007;7:76.
21. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10(4):506-13.
22. Chamras U, Sukunthamala K, Pornprasert S. SYTO9 and SYBR GREEN1 with high resolution melting analysis for molecular confirmatory testing of the common Southeast Asian beta(0)-thalassemia mutations. *Hemoglobin.* 2009;33(6):539-45.
23. Giglio S, Monis PT, Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(22):e136.



CMU CHIANG MAI
UNIVERSITY

โครงการ CMU KM Day ประจำปี 2567

“60 ปี มช. ร่วมสร้างสรรค์นวัตกรรมสู่ Innovation University”

อุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี | 11 ธันวาคม 2567

24. Lipsky RH, Mazzanti CM, Rudolph JG, Xu K, Vyas G, Bozak D, et al. DNA melting analysis for detection of single nucleotide polymorphisms. Clin Chem. 2001;47(4):635-44.
25. Khamphikham P, Hanmanoviriya O, Wongpalee SP, Munkongdee T, Paiboonsukwong K, Jopang Y, et al. Development of molecular diagnostic platform for $\alpha(0)$ -thalassemia 44.6 kb (Chiang Rai, --(CR)) deletion in individuals with microcytic red blood cells across Thailand. Ann Hum Genet. 2023.