09/0115/38

บทความปริทัศน์

ความรู้เรื่องธาลัสซีเมีย
Knowledge About Thalassemia

รัตนา สินธุภัค*

Abstract : **Ratana Sindhuphak. 1995. Knowledge about Thalassemia. Thai J Hlth Resch 9 (2) : 97-113**

Thalassemias are a heterogenous group of genetic disorder anemia with high incidence. About one per cent of the Thai population are affected with thalassemic diseases. Thirty to fourty per cent of the population are thalassemia carriers of at least one of the abnormal genes. The prevention and control can be approached either by appropriate population screening and genetic counselling in an attempt to discourage reproduction by proven carriers, or by a programme of appropriate screening followed by antenatal diagnosis for women at risk of having affected fetuses.

Key words : *Thalassemia; Thalassemia carrier; Prevention and control; Appropriate screening method; Standard method; Genetic counselling; Prenatal diagnosis.*

บทคัดย่อ : **รัตนา สินธุภัค. 2538. ความรู้เรื่องธาลัสซีเมีย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9 (2): 97-113**

ธาลัสซีเมีย เป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรม มีอุบัติการณ์สูง ประชากรไทยประมาณ 1% เป็นโรคนี้ โดยพบพาหะธาลัสซีเมีย ซึ่งเกิดจากความผิดปรกติของยีนอย่างน้อยหนึ่งยีน ประมาณ 30-40% ของประชาชนทั่วประเทศ การป้องกันและควบคุมทำได้ โดยการตรวจกรองพาหะธาลัสซีเมีย และการให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ หรือการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในสตรีที่เสี่ยงต่อการมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมีย

คำสำคัญ : *ธาลัสซีเมีย ; พาหะของโรคธาลัสซีเมีย ; การป้องกันและควบคุม ; การตรวจคัดกรองที่เหมาะสม ; การตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน ; การให้คำปรึกษาทางพันธุศาสตร์ ; การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์*

*สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330
Institute of Health Research, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

01/0P1/38

ธาลัสซีเมีย (Thalassemia) เป็นโรคโลหิตจางทางพันธุกรรม เกิดจากความผิดปกติของยีน ทำให้มีการสร้างสายโกลบินชนิดใดชนิดหนึ่งลดน้อยลง หรือสร้างไม่ได้เลย ฮีโมโกลบิน ประกอบด้วย ฮีม และโกลบิน โกลบินเป็นโปรตีน ประกอบด้วยสายโพลีย์เปปไทด์ 4 สาย ต่ออณู ฮีโมโกลบินหลัก ในคนปกติประกอบด้วย สาย alpha (α) และ beta (β) อย่างละ 2 เส้น ถ้ามีการสร้าง สาย α ลดลง เรียกว่า $\alpha-$thalassemia ถ้ามีการสร้างสาย β ลดลง เรียกว่า $\beta-$thalassemia ผู้ที่มียีนผิดปกติเพียงยีนเดียว บนโครโมโซมข้างหนึ่ง เรียกว่า heterozygote (ผู้เป็นพาหะ) จะไม่เป็นโรค ถ้ายีนทั้งสองอันที่อยู่บนโครโมโซมที่คู่กันผิดปกติ จะเกิดเป็นโรคธาลัสซีเมียขึ้น (Weatherall and Clegg, 1981)

อุบัติการณ์ของธาลัสซีเมีย (Wasi *et al.*, 1980; Fucharoen and Winichagoon, 1987) พบพาหะของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ ในประเทศไทย หลายชนิด

$\alpha-$thalassemia	20 – 30%
Haemoglobin E	13%
$\beta-$thalassemia	3 – 9%
Haemoglobin Constant Spring (CS)	4%

ธาลัสซีเมียไม่ได้กระจายอยู่เท่า ๆ กันทั่วประเทศ โดยเฉลี่ยแล้ว อุบัติการของยีนธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในประชากรไทย สรุปได้ดังนี้

ชนิดของธาลัสซีเมีย*	กรุงเทพฯ	เชียงใหม่	อีสาน
$\alpha-$thalassemia 1	3.5%	12%	–
$\alpha-$thalassemia 2	16%	19%	–
$\beta-$thalassemia	3%	9%	2 – 6%
Hb E	13 – 17%	–	32 – 60%

* ข้อมูลจาก สถานการณ์ปัจจุบันและกลวิธีในการป้องกันและควบคุมโรคเลือดในประเทศไทย รายงานทางวิชาการ คณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญโรคเลือด กระทรวงสาธารณสุข 2532-2533 (Expert Committee 1989 – 1990)

จากอุบัติการดังกล่าว จึงประมาณได้ว่าผู้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของธาลัสซีเมีย ชนิดใดชนิดหนึ่งแฝงอยู่ (เป็นพาหะ) มีประมาณ 30-40% ของประชากรทั้งประเทศ และผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของยีนเหล่านี้ประมาณ 1% หรือ 500,000 คน (Panich *et al.*, 1992)

ปัญหาของธาลัสซีเมีย

1. ปัญหาทางสังคม ผู้ป่วยธาลัสซีเมียจะต้องได้รับการดูแลตลอดชีวิต ซึ่งเป็นภาระของครอบครัว ญาติพี่น้อง ตลอดจนสังคม

2. ปัญหาทางเศรษฐกิจ ต้องใช้งบประมาณในการตรวจวินิจฉัย และรักษาในแต่ละปีสูงมาก ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย homozygous $\beta-$thalassemia และ $\beta-$thalassemia/HbE ต้องเสียค่ารักษาพยาบาลประจำปี ค่ายาขับเหล็ก (พร้อม Syringe pump) ค่าตัดม้าม คิดเฉลี่ยปีละประมาณ 180,000-250,000 บาทต่อคน (เอกสารหมายเลข 1)

3. ปัญหาสาธารณสุข โรคธาลัสซีเมีย เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย เป็นโรคพันธุกรรมที่สำคัญที่สุดในโลกและในประเทศไทย การรักษาได้ผลจำกัดและสิ้นเปลืองมาก ดังนั้นการแก้

ปัญหาโรคธาลัสซีเมียให้ได้ผลจริงจัง คือ การป้องกันและควบคุมโรคเพื่อไม่ให้มีทารกเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย หรือลดจำนวนทารกเกิดใหม่ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียลงให้มากที่สุด

การป้องกันและควบคุม การที่จะดำเนินงานด้านนี้ให้ได้ผลสำเร็จต้องขึ้นอยู่กับความร่วมมือ จากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง และต้องดำเนินการเป็นลำดับขั้นตอน มีหลายประเทศที่ดำเนินการป้องกันและควบคุม การเกิดโรคธาลัสซีเมียในเด็กที่เกิดใหม่เป็นผลสำเร็จ เช่น ประเทศไซปรัส (Angastiniotis *et al.*, 1986) สหราชอาณาจักร (Modell and Petrou, 1988) กรีซ (Loukopoulos *et al.*, 1988) และอิตาลี (Kuliev, 1986; Cao *et al.*, 1989; Old *et al.*, 1989)

ขั้นตอนที่ควรจะดำเนินการมีดังนี้

1. มีข้อมูลเกี่ยวกับปัญหาธาลัสซีเมียในประเทศที่ถูกต้อง (Ostrowsky *et al.*, 1985; Kuliev, 1988)
2. ให้ความรู้แก่ประชาชน แพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์
3. ตรวจหา ผู้เป็นพาหะของธาลัสซีเมีย
4. ให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม
5. ตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์
6. รักษาผู้ป่วย

การให้ความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมีย ให้ความรู้กับประชาชน ให้เข้าใจเกี่ยวกับโรค การรักษา แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และที่สำคัญควรเข้าใจว่า ผู้ที่เป็นพาหะจะไม่เป็นโรค มีสุขภาพเหมือนคนปกติ แต่ถ้าแต่งงานกับผู้ที่เป็นพาหะ จึงจะเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย ถ้าประชาชนมีความเข้าใจในขั้นต้นดีพอก็จะยอมรับความผิดปกติและทำความเข้าใจกับปัญหาได้ ซึ่งจะต้องทำไปพร้อมกับบริการด้านการตรวจกรองพาหะ การให้คำแนะนำทางพันธุกรรม และการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์

แพทย์ และบุคลากรทางการแพทย์ ควรมีความรู้ และความเข้าใจเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียอย่างถูกต้อง โดยเฉพาะแพทย์ ต้องเข้าใจแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม รู้ว่า genotype แบบใดทำให้เกิดโรคธาลัส-ซีเมีย เพื่อจะได้ให้การวินิจฉัย แนะนำ และให้การรักษาได้โดยไม่ผิดพลาด

การตรวจหาพาหะของธาลัสซีเมีย ประกอบด้วยการตรวจหลายวิธี คือ

วิธีที่ตรวจได้ถูกต้องที่สุด

1. DNA mapping การตรวจวิเคราะห์ยีนด้วยเทคนิคนี้ เป็นวิธีที่ตรวจได้แม่นยำ สามารถตรวจพาหะ α – thalassemia และ Hb CS ได้ ซึ่งยากแก่การวินิจฉัยด้วยวิธีอื่น ๆ แต่เทคนิคนี้เสียค่าใช้จ่ายมาก และทำได้ในห้องปฏิบัติการบางแห่งที่มีการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาเท่านั้น ผู้ทำการตรวจต้องมีความสามารถเฉพาะด้านด้วย

2. วิธีทางอิมมูโนวิทยา สามารถตรวจพาหะ α – thalassemia และ Hb Constant Spring (CS) ได้เช่นกัน แต่จะต้องเตรียมแอนติบอดีย์ขึ้นก่อนในสัตว์ทดลอง ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง (Wasi *et al.*, 1979; Luo *et al.*, 1988)

วิธีมาตรฐาน เป็นวิธีที่ใช้ตรวจกันทั่วไป ประกอบด้วยการตรวจวิเคราะห์หลายวิธีร่วมกัน แต่ก็ไม่สามารถตรวจพาหะ α – thalassemia 2 และ Hb CS วิธีเหล่านี้ ได้แก่

1. Blood Indices (Pearson *et al.*, 1973; Schriever, 1975) วิธีนี้แสดงถึงค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง เป็นข้อบ่งชี้ถึงการมียีนแฝง (พาหะ) ที่ดี ปัจจุบันนี้การตรวจหาดัชนีเม็ดเลือดแดงใช้เครื่องมือ Coulter Counter

เป็นเครื่องที่ตรวจได้โดยอัตโนมัติ คำนวณค่าดัชนีเม็ดเลือดต่าง ๆ ได้ผลสมบูรณ์ออกมาจากเครื่องเลย ซึ่งจะได้ค่าที่เชื่อถือได้ของ Rbc count, Haemoglobin, Haematocrit, MCV, MCH และ MCHC (เอกสารหมายเลข 2) ตัวอย่าง ผู้มีระดับ ฮีโมโกลบิน มากกว่า 10 กรัม/ดล. ถ้ามี MCV (Mean Corpuscular volume) เล็กกว่าปกติ ผู้นั้นอาจเป็นพาหะชนิด $\alpha-$thalassemia 1 และ $\beta-$thalassemia เป็นต้น

2. Blood Smear การตรวจแผ่นเลือดดูลักษณะของเม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก ติดสีน้อย มีเม็ดเลือดแดงอ่อน หรือเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสหรือไม่ ดูจำนวนของ Reticulocyte และ Inclusion body (เอกสารหมายเลข 3) เช่นถ้าพบ inclusion body มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดแดงจะวินิจฉัยได้ว่าเป็นโรค Hb H

3. Haemoglobin Typing เป็นการตรวจดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้า และหาปริมาณของฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ด้วยวิธี electrophoresis หรือ microcolumn chromatography

- Starch gel electrophoresis (Gammack *et al.*, 1960) ดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของฮีโมโกลบินในสนามไฟฟ้า ช่วยในการวินิจฉัยผู้เป็นพาหะ HbE (พบ E และ A) homozygous HbE (พบ E อย่างเดียว) ส่วนผู้ที่เป็นพาหะ $\alpha-$ หรือ $\beta-$thalassemia จะพบฮีโมโกลบินชนิด A_2 และ A เช่นเดียวกับคนปกติ (เอกสารหมายเลข 4)

- Cellulose acetate electrophoresis (Marengo-Row, 1965) เป็นการหาปริมาณของฮีโมโกลบินในเลือด (เอกสารหมายเลข 5)

- Microcolumn chromatography (Huisman *et al.*, 1975) ตรวจหาปริมาณ Hb A_2 โดยเฉพาะ ที่ความเข้มข้นของเกลือน้อย ๆ Hb A_2 จะไม่ถูกจับโดย anion-exchanger ในขณะที่ Hb ชนิดอื่นจะถูกจับติดอยู่ จึงสามารถแยก Hb A_2 ออกมาได้จาก Hb ชนิดอื่น (เอกสารหมายเลข 6)

คนปกติ หรือผู้เป็นพาหะ $\alpha-$thalassemia จะมี Hb A_2 ประมาณ 2.5%

ผู้เป็นพาหะ $\beta-$thalassemia จะพบ Hb A_2 สูงประมาณ 5%

ผู้เป็นพาหะ HbE จะพบ Hb E ประมาณ 25-30% ถ้า Hb E ลดน้อยลงกว่านี้ แสดงว่าอาจมียีน $\alpha-$thalassemia 1 ร่วมด้วยภาวะโลหิตจาง จากการขาดธาตุเหล็ก

- Alkaline denaturation test (Singer *et al.*, 1951; Bauer *et al.*, 1974; Huisman and Jonxis, 1977) ใช้ตรวจหาปริมาณ Hb F โดยที่ Hb แทบทุกชนิด จะถูกทำลายด้วยด่าง และตกตะกอนด้วยสารละลาย acid ammonium sulfate ยกเว้น Hb F ที่สามารถทนต่อด่างได้ และจะอยู่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของด่าง และ acid ammonium sulfate ซึ่งสามารถวัดปริมาณได้ (เอกสารหมายเลข 7)

วิธีตรวจอย่างคร่าว ๆ

1. One tube osmotic fragility (OF) (Kattamis *et al.*, 1981) ตรวจหาความเปราะของเม็ดเลือดแดง เมื่อหยดเลือดลงในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.36% เม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด แต่เม็ดเลือดแดงของคนที่เป็นธาลัสซีเมีย หรือพาหะจะยังแตกไม่หมด เนื่องจากมีเม็ดเลือดแดงที่แตกยาก เช่น Target cell, hypochromic cell, polychromasia ปะปนอยู่ (เอกสารหมายเลข 8)

2. Dichlorophenol Indophenol (DCIP) precipitation test (Frischer and Bowman, 1975; Kulapongs *et al.*, 1976) อาศัยคุณสมบัติของสี DCIP ที่ทำให้โมเลกุลของ unstable haemoglobin เช่น HbE ตกตะกอน เนื่องจาก Hb มีความผิดปกติที่สาย β ทำให้การยึดเหนี่ยวระหว่างสาย α และ β ลดลง Hb จึงอยู่ในรูปของ monomer ในสารละลาย DCIP ทำให้เกิด free$-$SH group ซึ่งจะถูก oxidise โดยสีเกิดเป็นตะกอน (เอกสารหมายเลข 9)

การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม (Kuliev, 1986) วิธีนี้จะทำได้ต่อเมื่อมีการวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง จุดประสงค์ของการให้คำปรึกษา เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับทางเลือกและเพื่อหลีกเลี่ยงการมีลูกเป็นโรคพันธุกรรม ทำได้ 2 แบบคือ

- Prospective counselling เป็นการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรม ก่อนที่จะมีผู้ใดในครอบครัวเป็นโรค วิธีนี้อาจทำได้ในครอบครัวที่ยังไม่มีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย เป็นเพียงพาหะ แต่ยังไม่ได้แต่งงาน หรือ แต่งงานแล้วยังไม่มีลูก

- Retrospective counselling แบบนี้ใช้กับครอบครัวที่เคยมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย เพื่อช่วยให้ครอบครัวนั้น มีลูกที่ไม่เป็นโรคอีก

ขั้นตอนในการดำเนินงานประกอบด้วย

1. การประเมินอัตราเสี่ยง จะถูกต้องได้ก็ต่อเมื่อการวินิจฉัยพาหะถูกต้องแม่นยำ และต้องเข้าใจแบบแผนการถ่ายทอดยีนธาลัสซีเมีย โดยต้องมีความรู้ว่า genotype ใด ทำให้เกิดโรคแบบใด และ genotype ใดไม่เป็นโรค

การทำนาย genotype และอัตราเสี่ยงของการมียีนธาลัสซีเมียในลูก อาจใช้แผนภูมิโครโมโซมตามกฎของ Mendel (เอกสารหมายเลข 10)

เมื่อประเมินอัตราเสี่ยงได้แล้ว จะต้องมีวิธีที่เหมาะสมที่จะช่วยให้คู่สามีภรรยานั้นเข้าใจ และต้องย้ำว่าพาหะไม่เป็นโรค จะมีชีวิตอยู่ได้เหมือนคนปกติ

2. การให้ข้อมูลเกี่ยวกับโรค ซึ่งจะต้องอธิบายถึง

- อาการของโรค
- สาเหตุที่ทำให้เกิดโรค
- การดำเนินของโรค
- การรักษา
- ปัญหาและภาระที่อาจจะเกิดขึ้นต่อผู้ป่วยและครอบครัว

3. ทางเลือกเพื่อหลีกเลี่ยงการมีลูกเป็นโรค มีหลายวิธี เช่น การคุมกำเนิดไว้ไม่ให้มีลูก หรือ การวินิจฉัยโรคในทารกก่อนคลอด เป็นต้น การตัดสินใจว่าจะเลือกใช้วิธีการใด จะต้องขึ้นอยู่กับความจำเป็นและความเหมาะสมในแต่ละครอบครัว และขึ้นอยู่กับการตัดสินใจของคู่สามีภรรยาเอง

การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ (Weatherall *et al.*, 1985; Cao *et al.*, 1986 a,b) มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลว่า ทารกในครรภ์ของคู่สามีภรรยาที่มีความเสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมีย มีลูกเป็นโรคหรือไม่เป็น เพื่อพ่อแม่จะได้ข้อมูลในการเตรียมตัวและเตรียมใจสำหรับลูกที่จะเกิดมา และด้วยวิธีนี พ่อแม่สามารถเลือกทางที่จะให้ลูกที่เกิดมาใหม่เป็นปกติได้

การรักษาผู้ป่วย จุดประสงค์เพื่อ

1. ให้ผู้ป่วยและครอบครัวได้รับการวินิจฉัยโรค ได้รับคำแนะนำเกี่ยวกับสาเหตุของโรค การเกิดโรค และภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ อย่างถูกต้อง

2. ให้เลือดผู้ป่วยที่ซีด สำหรับ homozygous $\beta-$thalassemia และ $\beta-$thalassemia/HbE ที่มีระดับ Hb ต่ำกว่า 7 กรัม/ดล. ควรจะได้รับเลือดเป็นประจำให้มีค่าเฉลี่ยของ Hb ก่อนให้เลือดครั้งต่อไปอยู่ที่ระดับ 9-10 กรัม/ดล.

3. ให้ยาขับเหล็กในผู้ป่วยที่ภาวะเหล็กเกิน

4. ตัดม้ามในกรณีที่ผู้ป่วยต้องรับเลือดบ่อยมาก หรือมีข้อบ่งชี้ของ hyper – splenism

ซึ่งการรักษานี้จะทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตดีขึ้น และอยู่ได้ใกล้เคียงกับคนปกติ แต่การรักษาจำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก ส่วนวิธีปลูกถ่ายไขกระดูก ซึ่งรักษาให้หายขาดได้ ขณะนี้ยังมีข้อจำกัดมาก

การแก้ปัญหาที่ดีที่สุดคือ ป้องกันและควบคุมไม่ให้มีการเพิ่มของธาลัสซีเมียและพาหะในทารกเกิดใหม่ ด้วยการให้ความรู้เรื่องโรคธาลัสซีเมียกับประชากรทั่วไป การตรวจกรองพาหะของธาลัสซีเมีย การให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ เพื่อให้ได้ทารกที่เกิดใหม่ไม่เป็นโรค ถ้าไม่มีทางเลือก เพราะมีทารกที่เกิดใหม่เป็นโรค ก็ต้องให้การรักษาตลอดไป ทำให้การดำเนินงานนี้ครบวงจร ซึ่งสามารถจะหยุดยั้งการเกิดโรคธาลัสซีเมียได้ในอนาคตใกล้ ๆ นี้

การที่จะสามารถบริการด้านการให้คำปรึกษาทางพันธุกรรม แก่ประชาชนที่เป็นพาหะธาลัสซีเมียได้ทั่วประเทศ ต้องมีวิธีการตรวจกรองที่สามารถทำได้ในโรงพยาบาล หรือศูนย์อนามัยต่างจังหวัด และวิธีตรวจกรองนี้ต้องมีประสิทธิภาพ ทำได้เร็ว ใช้ได้กว้างขวาง และได้ผลถูกต้อง

วิธีทดสอบต่าง ๆ ที่มีใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไป ใช้ในการวินิจฉัยเพื่อให้การรักษาผู้ป่วยเท่านั้น ยังไม่มีรูปแบบของการนำวิธีการตรวจต่าง ๆ มาประกอบกัน เพื่อใช้ค้นหาพาหะธาลัสซีเมียในชุมชน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมมือกับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต 6 ขอนแก่น ทดลองหารูปแบบการตรวจกรองที่เหมาะสม ที่สามารถทำได้ในโรงพยาบาล หรือศูนย์อนามัยต่างจังหวัด ใช้เครื่องมือน้อย มีประสิทธิภาพและความถูกต้องสูง มีความเชื่อถือได้ ทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รู้ผลเร็ว ราคาถูก เป็นวิธีง่าย สามารถฝึกบุคลากรได้เร็ว และเป็นที่ยอมรับทางวิชาการ ผลการศึกษาการตรวจประกอบการวิเคราะห์ รูปแบบต่าง ๆ พบว่า รูปแบบที่ประกอบด้วย Blood indices, OF และ DCIP test เป็นรูปแบบที่มีความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ในการวินิจฉัย ผู้เป็นพาหะธาลัสซีเมียที่เชื่อถือได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Sindhuphak *et al* in press) แต่การจะเลือกรูปแบบใดยังต้องคำนึงถึง ความเหมาะสมในแต่ละท้องที่ด้วย

เอกสารอ้างอิง

Angastiniotis M, Kyriakidou S, and Hadjiminas M. 1986: How thalassemia was controlled in Cyprus. World Health Forum 7: 291-297

Bauer JD, Ackermann PG, and Toro G. 1974: Clinical laboratory method. 8th ed. CV Mosby Comp, St. Louis 107 – 108

Brown BA. 1988: Haematology: Principles and Procedures. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 161 – 2

Cao A, Falchi AM, Tuveri T, Scalas MT, Monni G, and Rosatelli C. 1986 a: Prenatal diagnosis of thalassemia major by fetal blood analysis: Experience with 1000 cases. Prenatal Diagnosis 6: 159 – 67

Cao A, Pirastu M, and Rosatelli C. 1986 b: Annotation : The prenatal diagnosis of thalassemia. British J of Haematology 63: 215 – 20

Cao A, Rosatelli C, Galanello R, Monni G, Olla G, Cossu P, and Ristaldi MS 1989 : The prevention of thalassemia in Sardinia. Clin Genet 36: 277 – 285

Dacie JV, and Lewis SM. 1984: Practical haematology 6th ed. London: Churchill Livingstone, 179 – 80

Expert Committee. 1989 – 1990 : Current Situation and Strategic Plan for Prevention and Control of Blood Diseases in Thailand. Academic Reports, Ministry of Public Health. 5 – 43

Frischer H, and Bowman JE. 1975 : Haemoglobin E an oxidatively unstable mutation. J Lab Clin Med. 35:531 – 9

Fucharoen S, and Winichagoon P. 1987 : Haemoglobinopathies in Southeast Asia. Haemoglobin 11: 65 – 88

Gammack DB, Huehns ER, Shooter EM, and Gerald PS. 1960: Identification of the abnormal polypeptide chain of haemoglobin G – Ib. J Molec Biol Dec; 2: 372 – 8

Hall R, and Malia RG. 1984 : Medical Laboratory Haematology, Butterworths, 347

Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AN, Mayson SM, and Jakway J. 1975 : Microchromatography of haemoglobins. III. A simplified procedure for the determination of haemoglobin A_2. J Lab Clin Med 86: 700 – 702

Huisman THJ, and Jonxis JHP. 1977 : The haemoglobinopathies: Technique of identification. New York

Kattamis C, Efremor G, and Pootrakul S 1981 : "Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting β– thalassemia trait. Journal of Medical Genetics 18 : 266-270

Kulapongs P, Sanguansermsri T, Mertz G, and Tawarat S. 1976: Dichlorophenol indophenol (DCIP) precipitation test: a new screening test of Hb E and H, Paediatr Soc Thailand. 15: 1 – 7

Kuliev AM. 1986 : Thalassemia can be prevented. World Health Forum. 7: 286 – 290

Kuliev AM. 1988: The WHO control program for hereditary anemias. Birth Defects 23(58):383—94

Loukopoulos D, Kaltsoya – Tassiopoulou A, and Fessas P. 1988 : Thalassemia control in Greece. In : Fucharoen S, Rowley PT, Paul NW, eds. Thalassemia : Pathophysiology and Management, Part B, New York: Alan R Liss, Inc. 405 – 416

Luo H, Clarke B J, Gauldie J *et al.* A novel monoclonal antibody based diagnostic test for α – thalassemia – 1 carrier due to the (– – SEA/) deletion. Blood 72: 1589 – 1594

Marengo – Row AJ. 1965 : Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. J Clin Pathol 18: 790 – 792

Modell B, and Petrou M. 1988 : Review of control programs and future trends in the United Kingdom. In: Fucharoen S, Rowley PT, Paul NW, Eds. Thalassemia: Pathophysiology and Management, Part B. New York : Alan R Liss, Inc. 433 – 442.

Old JM, Thein SL, Weatherall DJ, Cao A, and Loukopoulos D. 1989 : Prenatal diagnosis of the majoı haemoglobin disorders. Mol Biol Med 6: 55 – 63

Ostrowsky JT, Lippman A, and Scriver CR. 1985: Cost – benefit analysis of a thalassemia disease prevention program. ALPH July; 75 (7): 732 – 6

Panich V, Pornpatkul M, and Sriroongraeng W. 1992 : The problem of thalassemia in Thailand. Medicine & Public Health 23 Suppl; 2: 1 – 6

Pearson HA, O'Brien RT, and McIntosh S. 1973 : Screening for thalassemia trait by electronic measurement of mean corpuscular volume. N Engl J Med Feb; 288(7) : 351 – 3

Raven JL and Tooze JA. 1973 : α – thalassemia in Britain. Br. Med J 4: 486

Schriever BG. 1975 : Red cell indices in thalassemia minor. Ann Clin Lab Sci 4:339

Singer K, Chernoff AI, and Singer L. 1951: Studies on abnormal haemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other haematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood 6: 413 – 28

Sindhuphak R, Kaewsuk O, Srisukkoo P, Kittikalayawong A, Havanond P, Impand C, Tunsaringkarn K, Pattarapadungkit N, Yamarat K, Vivatpatanakul K, and Dusitsin N. Appropriate screening model for thalassemia carriers in rural regions in press in Journal of Health Science.

Wasi F, Pravatmuang P, and Winichagoon P. 1979 : Immunologic diagnosis of α – thalassemia traits. Haemoglobin. 3: 21 – 31

Wasi P, Pootrakul S, Pootrakul P, Pravatmuang P, Winichagoon P, and Fucharoen S. 1980 : Thalassemia in Thailand. Ann NY Acad Sci 344: 352 – 63

Weatherall DJ, and Clegg JB. 1981 : The thalassemia Syndromes. 3rd ed. Oxford : Blackwell Scientific Publications 133

Weatherall DJ, Ledingham JGG and Warrell DA. 1983 : Oxford Textbook of Medicine : Section 19, Diseases of the blood. Oxford University Press. volume 2: 19.1 – 19.3

Weatherall DJ, Old JM, Thein SL, Wainscoat JS, and Clegg JB. 1985 : Prenatal diagnosis of the common haemoglobin disorders. J of Medical Genetics 22: 422 – 30

ภาคผนวก

เอกสารประกอบคำอธิบาย

เอกสารหมายเลข 1

ผลกระทบด้านเศรษฐกิจของผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย (Expert Committee 1989 – 1990)

Homozygous α – thalassemia

		ค่ารักษาพยาบาล/คน/ปี
ค่ารักษาพยาบาลประจำ (ค่าเลือด ค่าห้องพัก, ค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการ ฯลฯ)		33,300.- บาท
ค่ายาขับเหล็ก		109,200.- บาท
ค่า Syringe pump สำหรับให้ยาขับเหล็ก (มีอายุการใช้งานอันละประมาณ 3-5 ปี)		25,000.- บาท
ค่าตัดม้าม		15,000.- บาท
	รวมเงิน	182,500.- บาท

β– thalassemia/Hemoglobin E

ค่ารักษาพยาบาลประจำ		16,350.- บาท
ค่ายาขับเหล็ก		213,200.- บาท
ค่า Syringe Pump สำหรับให้ยาขับเหล็ก		25,000.- บาท
ค่าตัดม้าม		15,000.- บาท
	รวมเงิน	269,550.- บาท

เอกสารหมายเลข 2

Blood indices การหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง Coulter Counter ซึ่งเป็นเครื่องมือ electronic ประกอบด้วย diluting apparatus และ computer modules ทำให้ได้ผลถูกต้องและแม่นยำของ :-

- จำนวนเม็ดเลือดแดง (Red blood cell count, Rbc count) มีหน่วยเป็น ล้าน/มม.^{3}
- ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน (Haemoglobin, Hb) มีหน่วยเป็น กรัม/ดล. หรือ กรัม %
- ฮีมาโตคริท (Haematocrit, Hct) ความสัมพันธ์ของ ratio ระหว่าง cell volume ของ red cells และ whole blood มีหน่วยเป็น %
- Mean corpuscular volume (MCV) ค่าเฉลี่ยของ cell volume ของเม็ดเลือดแดง มีหน่วยเป็น fl (femtoliter)
- Mean corpuscular haemoglobin (MCH) ค่าเฉลี่ยของ haemoglobin ใน individual red blood cell มีหน่วยเป็น pg (picogram)
- Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของ haemoglobin ในเม็ดเลือดแดง มีหน่วยเป็น กรัม %

ค่าปกติของดัชนีเม็ดเลือดแดงแสดงไว้ในตาราง (Weatherall *et al.*, 1983)

Blood indices	**range**	
	ชาย	**หญิง**
Rbc count (ล้าน/มม.^{3})	4.5 – 6.5	3.9 – 5.6
Hb (กรัม %)	13.5 – 18.0	11.5 – 16.0
Hct (%)	40.0 – 54.0	37.0 – 47.0
MCV (fl)	81 – 100	
MCH (pg)	27 – 32	
MCHC (กรัม %)	32 – 36	

เอกสารหมายเลข 3

Blood Smear การตรวจแผ่นเลือดเพื่อดูลักษณะของเม็ดเลือดแดง (Rbc morphology) ดูจำนวน reticulocyte และ inclusion body

Rbc morphology

วิธีการ

1. หยด EDTA blood 1 หยดบน slide smear ให้บางและทิ้งไว้ให้แห้ง
2. นำแผ่นเลือดมาย้อมด้วย Wright's stain และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เม็ดเลือดแดงปกติ จะมีลักษณะของ normochromic และ normocytic

เม็ดเลือดแดงผิดปกติ อาจมีการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างหรือคุณสมบัติของการติดสี จะได้ลักษณะเม็ดเลือดแดงที่ผิดไปจากปกติ ต่าง ๆ กันดังนี้ (Weatherall *et al.*, 1983)

ชนิดของเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติ	การวินิจฉัย
Hypochromia	- ขาดเหล็ก หรือความบกพร่องในการสร้าง Hb
Microcytosis	- ขาดเหล็ก หรือความบกพร่องในการสร้าง Hb
Macrocytosis	- erythropoiesis or haemolysis
Anisochromia	- มีการสร้างเม็ดเลือดแดงอ่อน เนื่องจากเกิด haemolysis
Anisocytosis	- เม็ดเลือดแดงมีขนาดแตกต่างกัน
Spherocytosis	- เกิดจาก genetic disorder ของผนังเม็ดเลือดแดง
Elliptocytes	- เกิดจาก genetic disorder ของผนังเม็ดเลือดแดง
Target cells	- deficient haemoglobinization หรือ hyposplenism
Poikilocytes รวมทั้ง burr cells, helmet cells (schistocytes)	- trauma to red cells หรือ severe oxidant damage มีรูปร่างผิดปกติแตกต่างกัน

การตรวจ inclusion bodies (Hb H) และ reticulocyte count (Raven and Tooze, 1973)

1. หยด staining solution (1% Brilliant cresyl blue ใน ethanol) บน microscopic slide 1 หยด และสเมียร์ให้บาง ๆ
2. หยดเลือด 1 หยดเล็ก ๆ บน slide ดังกล่าว
3. ปิดด้วย cover slip และ seal ด้วย vasaline
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวน reticulocytes ซึ่งจะเห็นเป็น network ของเส้นใยละเอียดสีฟ้า ส่วน inclusion bodies จะเห็นเป็นจุดเล็ก ๆ สีฟ้า

จำนวน reticulocytes จะคิดเป็น % ของเม็ดเลือดแดง ในคนปกติ จะประมาณ 0.8-2.0%

inclusion bodies ถ้าพบก็จะถือว่าผลเป็น positive

หมายเหตุ Hb H disease จะพบเม็ด inclusion bodies เกือบ 100%

α-thal 1 trait จะพบ inclusion bodies ได้น้อย ซึ่งสามารถเพิ่มความไวของการตรวจได้โดยนำเลือดไปปั่น แล้วดูดเม็ดเลือดแดงชั้นใต้ buffy coat มาทำการทดสอบ จะเห็นเม็ดเลือดแดงที่มี inclusion bodies ประมาณ 0-1 เซลล์ต่อ oil field

เอกสารหมายเลข 4

การตรวจหาชนิดของ ฮีโมโกลบินโดยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

หลักการ ฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ประกอบด้วยจำนวนประจุไฟฟ้าของกรดอะมิโนที่มารวมกันเป็นจำนวนคงที่ คุณสมบัติของประจุรวมที่ต่างกันในฮีโมโกลบินแต่ละชนิด ทำให้สามารถแยกฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้ในสนามประจุไฟฟ้า

การเตรียมน้ำละลายฮีโมโกลบิน (Haemolysate preparation) มีหลายวิธี (Dacie and Lewis, 1984; Hall and Malia, 1984; Brown, 1988) มีรายละเอียดดังนี้

1. เลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง (EDTA blood) 3.0 ml นำมาปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm (1,200 g) 15 นาที ดูดแยกส่วนที่เป็นน้ำเหลืองทิ้งไป

2. ล้างเลือดส่วนที่เหลืออยู่ด้วย 0.9% NaCl นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 15 นาที ดูดส่วนบนทิ้งไป ทำซ้ำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง

3. เติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับปริมาตรของเม็ดเลือดแดง และเติม Carbon tetrachloride ปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรของเม็ดเลือดแดง เขย่าด้วย vortex mixer อย่างแรง 5 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก และนำมาปั่นที่ 3,000 rpm นาน 15 นาที

4. ค่อย ๆ ดูดสารละลายฮีโมโกลบิน ซึ่งอยู่ส่วนบน ใส่ในหลอดเพื่อเก็บไว้ทดสอบ Hb typing ต่อไป ถ้ายังไม่ทดสอบทันที ควรเก็บไว้ที่ -20°ซ.

Starch gel electrophoresis

1. เตรียม Starch gel ใน tray พลาสติก ขนาดกว้าง 12 ซม. ยาว 26 ซม. หนา 0.6 ซม. ความเข้มข้นของ starch 14%

2. ใช้ combs (slot formers) ทำให้เกิดช่องบนแผ่น starch gel 6-8 ช่อง

3. หยด haemolysate ที่เตรียมไว้ข้างต้น ในช่อง (slot) โดยใช้ capillary tubes

4. วาง starch gel tray บนเครื่อง electrophoresis chamber มีกระดาษกรองเชื่อมระหว่าง buffer และ starch gel tray

5. เปิดกระแสไฟฟ้า ที่ 300-400 volts อุณหภูมิ 4°C (ในตู้เย็น) เป็นเวลา 2 ชม.

6. ย้อมแผ่น starch gel ด้วย orthodianisidine ประมาณ 5-10 นาที และ fix gel ด้วย fixing solution (2 ครั้ง) จะเห็นแถบของฮีโมโกลบิน ชัดเจน

หมายเหตุ Hb Constant Spring (CS) detect ได้ยาก เนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก การใช้ fresh haemolysate และการเพิ่มขนาดของ slot เพื่อเพิ่มปริมาณของ haemolysate อาจทำให้เห็นแถบของ Hb CS ชัดขึ้น

เอกสารหมายเลข 5

Cellulose acetate electrophoresis (Marengo-Row, 1965) เพื่อหาปริมาณของ Hb

วิธีการ

1. แช่แผ่น cellulose acetate strip ใน tris EDTA borate buffer pH 8.5 ประมาณ 10 นาที

2. นำแผ่น strip ออกมาซับให้หมาด แล้วใช้ applicator หยด haemolysate ลงบนแผ่น strip หยดซ้ำ 2 ถึง 3 ครั้ง ให้ได้แถบที่เข้มพอควร

3. นำแผ่น cellulose acetate ไปวางระหว่าง chamber โดยใช้กระดาษกรอง เป็นสะพาน ใช้ Tris EDTA borate buffer pH 9.0 เป็นตัวนำไฟฟ้า โดยวางให้ปลายด้านที่หยด haemolysate ไว้ อยู่ทางขั้วลบ

4. เปิดกระแสไฟฟ้า 380 volts ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หรือจนกว่าจะเห็น แถบของ haemolysate แยกกันชัดเจน

5. นำแผ่น strip ออกมาจาก chamber ใช้กรรไกรตัดแยกแถบของ haemoglobin ใส่หลอดแก้วไว้ เติมน้ำกลั่น 1.5 มล. สำหรับแถบ **Hb A_2** และ 6 มล. สำหรับ แถบ **Hb A** (สำหรับ Hb อื่น ๆ ให้เติมน้ำกลั่นตามความเข้มของสี) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที (หรือไว้ค้างคืนที่ 4°ซ) แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

6. คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ Hb A_2

$$\% \text{ Hb } A_2 = \frac{\text{OD } A_2}{\text{OD } A_2 + (\text{OD A} \times 4)} \times 100$$

เอกสารหมายเลข 6

Microcolumn chromatography (Huisman *et al.*, 1975) การหาปริมาณของ Hb A_2 โดยใช้ salt gradient

หลักการ ที่ pH 7.5 ใน glycine KCN buffer ถ้ามีความเข้มข้นของเกลือน้อย ๆ Hb A_2 จะไม่ถูกจับโดย anion exchanger ในขณะที่ Hb ชนิดอื่นจะถูกจับติดอยู่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้มากขึ้น Hb ทุกชนิดจะหลุดออกจาก anion exchanger ทั้งหมด

วิธีการ

1. เตรียม column โดยใช้สำลีบาง ๆ อุดรอยคอดของ pasteur pipette ตั้งไว้ในแนวดิ่ง

2. เติม working DE cellulose ลงใน column ให้สูงประมาณ 3–5 ซม.

3. เจือจาง haemolysate ด้วย developer A (0.2 M glycine 0.05 M NaCl 0.01% KCN) 1:4 เติมลงบนผิวหน้าของ column ประมาณ 2 หยด เติม working DE cellulose ปิดผิวหน้าของ haemolysate ให้สูงประมาณ 0.3–0.5 ซม.

4. ต่อ syringe ขนาด 5 มล. เข้ากับ pasteur pipette เติม developer A 5.0 มล. รองรับส่วนของ buffer ที่พา Hb A_2 ออกมา และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มล. วัด OD ที่ 415 นาโนเมตร เป็นค่า **OD A_2** โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

5. เติม developer B (0.2 M glycine 0.2 M NaCl 0.01% KCN) อีก 5 มล. รองรับส่วนของ buffer ที่พา Hb ที่เหลือออกมา ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มล. (ถ้าสีเข้มมากให้ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล.) วัด OD ที่ 415 นาโนเมตร เป็นค่า **OD A**

6. คำนวณค่า **% Hb A_2** ดังนี้

$$\%\ \text{Hb } A_2 = \frac{\text{OD } A_2}{\text{OD } A_2 + (\text{OD A} \times 2.5)} \times 100$$

ถ้าปรับปริมาตรของ OD A ให้ได้ 50 มล. ให้เปลี่ยนค่า 2.5 เป็น 5 แทน

เอกสารหมายเลข 7

Alkaline denaturation test (Singer *et al.*, 1951; Bauer *et al.*, 1974; Huisman and Jonxis, 1977) ใช้หาปริมาณของ Hb F ด้วยวิธีนี้พบว่า Hb F ชนิดเดียวที่สามารถทนต่อด่างได้ ไม่ตกตะกอน ส่วนฮีโมโกลบินอื่น ๆ จะตกตะกอนหมด

วิธีการ

1. ดูดน้ำละลายเลือด (haemolysate) 0.1 มล. ลงในหลอดที่มี 1.6 มล. ของ N/12 KOH อยู่ก่อนแล้ว เริ่มต้นจับเวลาทันที เขย่าหลอดทดลองให้เลือดเข้ากับน้ำยา
2. เมื่อครบ 1 นาที เติม 50% saturated acid ammonium sulfate 3.4 มล. ลงในหลอดทดลองทันที ผสมให้เข้ากัน
3. กรองส่วนผสมด้วยกระดาษกรองจะได้ **"filtrate"**
4. ทำ **"total" haemoglobin** โดยใส่ haemolysate 0.02 มล. ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากัน
5. เตรียม blank สำหรับ filtrate โดยใช้ N/12 KOH 1.6 มล. และ 50% saturated acid ammonium sulfate 3.4 มล.
6. เตรียม blank สำหรับ total โดยใช้น้ำกลั่น 5 มล.
7. หยด cyanide solution 2 หยด ลงในหลอดทุกหลอด เพื่อเปลี่ยนฮีโมโกลบินทุกชนิดให้เป็น cyan-methaemoglobin
8. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
9. คำนวณปริมาณของ Hb F ดังนี้

$$\% \text{ Hb F} = \frac{\text{OD ``filtrate''} \times 20}{\text{OD ``total''}}$$

ค่าปกติของ Hb F อายุ 3 ปีขึ้นไป < 1%
ค่าเฉลี่ย = 0.48 ± SD 0.24%

หมายเหตุ Hb bart's บางส่วนก็สามารถทนต่อภาวะด่างได้เช่นกัน haemolysate ที่มีส่วนผสมของ Hb bart's อยู่ จะทำให้ค่า % Hb F สูงกว่าความเป็นจริงได้

เอกสารหมายเลข 8

One tube Osmotic fragility (OF) (Kattamis *et al.,* 1981)

หลักการ ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.36% เม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด แต่เม็ดเลือดแดงของคนที่เป็นธาลัสซีเมีย หรือพาหะจะยังแตกไม่หมด เนื่องจากมีเม็ดเลือดแดงที่แตกยาก เช่น target cell, hypochromic cell, polychromasia ปะปนอยู่ สามารถแยกผู้เป็นพาหะหรือผู้ป่วยธาลัสซีเมียอย่างคร่าว ๆ ได้

วิธีการ

1. ดูดเลือด (EDTA blood) 0.02 มล. ใส่ใน**หลอด A** ที่มี 0.36% NaCl buffer solution 5 มล. และใส่ใน **หลอด B** ที่มี น้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2. นำไปปั่นที่ 3,000 rpm 5 นาที เอาส่วนใสไปวัดค่า OD ที่ ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3. คำนวณเปอร์เซ็นต์ haemolysis ดังนี้

$$\% \text{ haemolysis} = \frac{\text{OD ``A''} \times 100}{\text{OD ``B''}}$$

การรายงานผล

	% haemolysis
คนปกติ	92.2 ± 7.4
Hb E trait	70.2 ± 18.7
α – thal trait	54.4 ± 20.8
β – thal trait	48.7 ± 20.9

เอกสารหมายเลข 9

Dichlorophenol indophenol (DCIP) precipitation test (Frischer and Bowman, 1975)

หลักการ สี DCIP จะทำให้ Hb E เสียเสถียรภาพกลายเป็นตะกอนปนอยู่ในสารละลาย Hb ที่ไม่อยู่ตัวอื่น ๆ เช่น Hb H, Hb Bart's ก็สามารถถูก oxidise ให้ตกตะกอนได้ด้วยสี DCIP เช่นกัน

วิธีการ

1. นำ EDTA Blood มาปั่นที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำเหลืองทิ้งไป

2. ดูดเฉพาะเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลอด 0.02 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่มี DCIP reagent 5 มล. ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

3. ต่อจากนั้นนำไปอุ่นที่ 37°ซ. 1 ชม.

4. อ่านผลโดยดูตะกอนที่เกิดขึ้นในหลอด หรือ วัด OD ที่ 800 นาโนเมตร ที่ เวลา 60 และ 120 นาที เพื่อดูปริมาณของตะกอน

การรายงานผล

0 = สารละลายใส สีฟ้าอมเขียว ไม่มีตะกอน

1^+ = สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว ไม่มีตะกอน

2^+ = สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนกระจายอยู่ทั่วไป

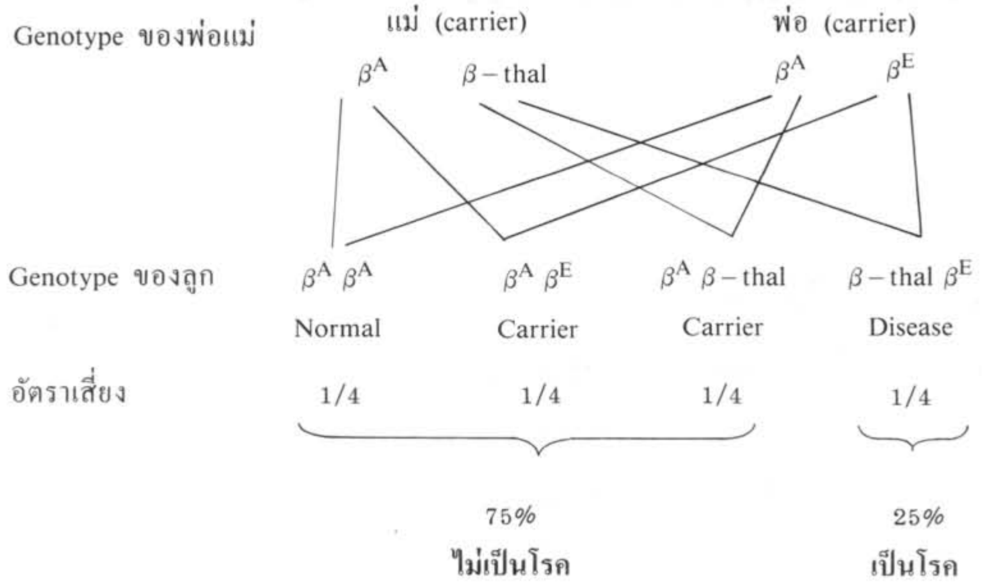
3^+ = สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนบางส่วนตกอยู่ก้นหลอด

4^+ = สารละลายขุ่น สีฟ้าอมเขียว พบตะกอนทั้งหมดอยู่ที่ก้นหลอด

Hb ปกติ	=	0
heterozygote Hb E	=	1^+, 2^+
homozygote Hb E	=	3^+, 4^+
Hb H disease	=	1^+, 2^+
β – thal/Hb E	=	1^+, 2^+

เอกสารหมายเลข 10

แผนภูมิโครโมโซม เพื่อ ทำนาย Genotype และอัตราเสี่ยงของการมียีนธาลัสซีเมียในลูก ตามกฎของ Mendel



ด้วยกฎของ Mendel โอกาสที่ เบต้า-ธาลัสซีเมียและพาหะ จากพ่อแม่จะถ่ายทอดไปสู่ลูก ได้ใน 4 กรณี ด้วยกันคือ

	ชนิดยีนของพ่อแม่	โอกาสที่ลูกจะเป็นโรค	โอกาสที่ลูกจะไม่เป็นโรค	
			เป็นพาหะ	ปกติ
กรณีที่ 1	พาหะ และ ปกติ	0%	50%	50%
กรณีที่ 2	พาหะ และ พาหะ	25%	50%	25%
กรณีที่ 3	พาหะ และ เป็นโรค	50%	50%	0%
กรณีที่ 4	เป็นโรค และ เป็นโรค	100%	0%	0%