

การประชุมสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 20
โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กทม. 17-19 ธันวาคม 2557

Thalassemia prevention and control: role of laboratory

รองศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.)

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



บทนำ

Average statistic

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นโรคพันธุกรรมทางโลหิตวิทยา ซึ่งมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 20-30 ของประชากรมียืน alpha (α)-thalassemia ร้อยละ 3-9 มียืน beta (β)-thalassemia และพบยืนของฮีโมโกลบินผิดปกติ 2 ชนิด คือ hemoglobin E (Hb E) โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 13 และพบสูงขึ้นในคนอีสานถึงร้อยละ 30-40 ที่จังหวัดสุรินทร์พบ Hb E สูงถึงร้อยละ 52 ฮีโมโกลบินผิดปกติอีกชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อย คือ Hb Constant Spring (Hb CS) พบประมาณร้อยละ 1-8 อุตการณ์ดังตารางที่ 1

**MICROMAPPING OF THALASSEMIA AND HEMOGLOBINOPATHIES
IN DIFFERENT REGIONS OF NORTHEAST THAILAND AND VIENTIANE,
LAOS PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC**

Hemoglobin, 36(1):47–56, (2012)

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

ISSN: 0363-0269 print/1532-432X online

DOI: 10.3109/03630269.2011.637149

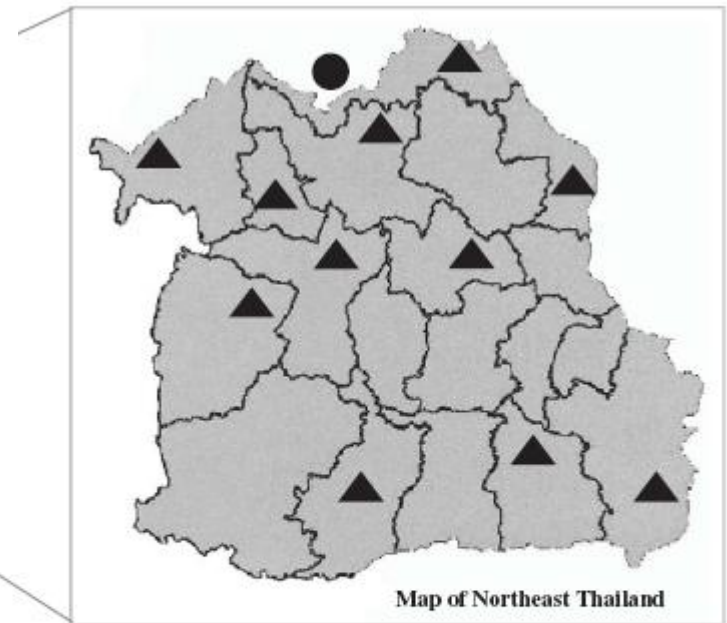
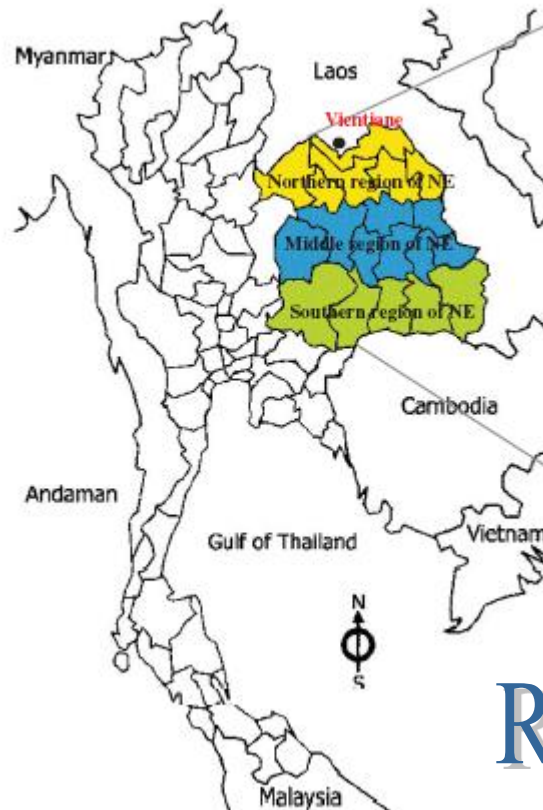
Jaruwan Tritipsombut,^{1,2} Kanokwan Sanchaisuriya,² Prachatip Phollarp,²
Dalouny Bouakhasith,³ Pattara Sanchaisuriya,⁴ Goonnapa Fucharoen,²
Supan Fucharoen,² and Frank P. Schelp⁴

¹Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical

การสำรวจใหม่
ที่ภาคอีสาน

เหนือ
กลาง
ใต้
และ
เวียงจันทน์



Recently updated data

ภาคอีสานมี Hb E และ α - thal มาก แต่มี β - thalassemia น้อย

TABLE 1 Prevalence and Gene Frequency of Hb E, α^0 - and β -Thalassemia in 1,460 Northeast Thai and 349 Laotian Subjects (95% confidence interval in parentheses)

Types of Thalassemia	Northeast Thailand			Vientiane, Laos PDR			<i>p</i> Value ^a
	<i>n</i>	Prevalence	Gene Frequency	<i>n</i>	Prevalence	Gene Frequency	
Hb E ^b	609	41.7 (39.2–44.3)	0.238 (0.223–0.253)	105	30.1 (25.3–35.2)	0.173 (0.145–0.202)	<0.001
α^0 -Thalassemia ^c	85	5.8 (4.7–7.1)	0.029 (0.024–0.036)	30	8.6 (5.9–12.0)	0.043 (0.029–0.061)	0.089
β -Thalassemia	13	0.9 (0.5–1.5)	0.005 (0.003–0.008)	8	2.3 (1.0–4.5)	0.011 (0.005–0.022)	0.110

^aTest for prevalence difference.

^bIncluding individuals with heterozygous and homozygous states.

^cMost carried the SEA deletion except one Thai subject with the THAI deletion.

Updated data for Northeast Thailand

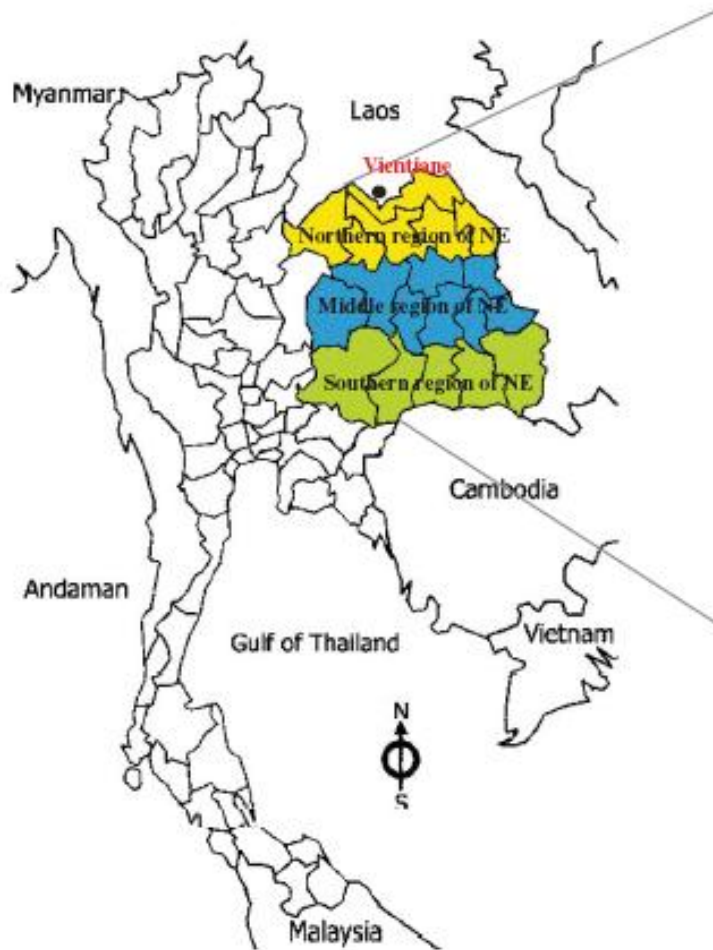
TABLE 4 Comparison of Frequencies of Thalassemia and Hemoglobinopathies in Populations of Northeast Thailand and Neighboring Countries

Types of Thalassemia	NE Thailand	Vientiane, Laos PDR	South Laos (15,16)	Cambodia (17,18)	South Vietnam (19)
α^0 -Thalassemia ^a	0.029	0.043	0.006 ^b	0.010 ^c	0.017–0.034 ^d
α^+ -Thalassemia ^e	0.107	0.046	0.381 ^b	0.162 ^c	0.017–0.220 ^d
β -Thalassemia	0.005	0.011	N.A.	0.0156 – 0.017 ^f	0.001–0.046 ^g
Hb E	0.238	0.172	0.253 – 0.433 ^h	0.151 – 0.299 ^f	0–0.356 ^g
Hb CS	0.053	0.029	0.113 ^b	0.023	0–0.030 ^d
Hb Paksé	0.004	0.003	N.A.	0.002	0–0.002 ^d

α^+ - thalassemia is ~ 5 times more common than α^0 - thalassemia

... ภาคอีสานมีชนิดและความถี่ของ
ยีนแตกต่างจากภูมิภาคอื่น ...

... ควรเลือกแนวทางการตรวจ
การวินิจฉัย และ การให้คำปรึกษา
แนะนำทางพันธุกรรม ที่เหมาะสม ...



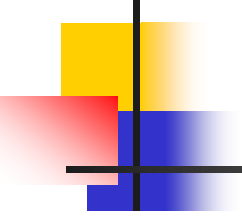
แนวทางการวินิจฉัยโรคและพาหะโรค โลหิตจางธาลัสซีเมียโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

แนวทางการวินิจฉัยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย

ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียจะมีอาการทางคลินิกดังกล่าวข้างต้น และมีผลการตรวจเลือดดังนี้

1. การตรวจเลือด (complete blood count, CBC) พบว่าซีด ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (MCV, MCH) มีค่าต่ำกว่าปกติ เม็ดเลือดแดงบนสเมียร์เลือดมีลักษณะติดสีจาง (hypochromia) ขนาดเล็ก (microcytosis) และรูปร่างผิดปกติ (poikilocytosis)
2. การตรวจ Hb H inclusion body โดยการ incubate เม็ดเลือดแดงด้วยสีย้อม brilliant cresyl blue หรือ new methylene blue จะเห็นเป็นจุดตะกอนกระจายอยู่ในเม็ดเลือดแดง ทำให้เห็นเม็ดเลือดแดงมีลักษณะคล้ายลูกกอล์ฟ ให้ผลบวกในโรค Hb H disease
3. การตรวจชนิดของฮีโมโกลบิน (Hb typing, hemoglobin analysis) เป็นการตรวจยืนยัน (definite diagnosis) เพื่อจำแนกชนิดของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติให้แน่นอน (ตารางที่ 6 และ 7) แพทย์ควรส่งตรวจชนิดของฮีโมโกลบินก่อนให้เลือดครั้งแรกหรืออย่างน้อย 3 เดือนหลังจากให้เลือดครั้งสุดท้ายเพื่อการแปลผลที่ถูกต้อง

วินิจฉัย
ผู้ป่วย



การวินิจฉัยพาหะ เห็น 3 โรค

แนวทางการวินิจฉัยพาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ

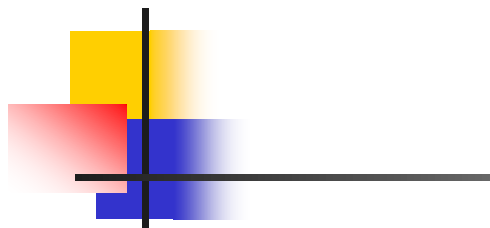
การตรวจกรองพาหะ (screening test) ของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ มีจุดประสงค์เพื่อค้นหาผู้ที่เป็พาหะของ β thalassemia, α -thal 1 และ Hb E เพื่อควบคุมและป้องกันโรคเป้าหมาย 3 โรค ได้แก่ homozygous β thalassemia, β thalassemia/Hb E และ Hb Bart's hydrops fetalis ถ้าได้ผลบวกจากการตรวจกรอง ต้องทำการตรวจยืนยัน (confirmation test) โดยวิธีมาตรฐานต่อไป



Targets of thalassemia screening

(National policy)

- α - thalassemia 1
- β - thalassemia
- Hb E



การตรวจกรองพาหะโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย ที่ใช้ในปัจจุบันมี 4 วิธีได้แก่

1. **ดัชนีเม็ดเลือดแดง** (red cell indices) ประกอบด้วย MCV (mean cell volume) และ MCH (mean cell hemoglobin) เป็นค่าที่ได้จากการตรวจวัดโดยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ในผู้ใหญ่ค่า MCV <80 fL และหรือ MCH <27 pg พบในพาหะของ β thalassemia หรือ α thalassemia 1 สำหรับในเด็กเนื่องจากค่าปกติทางโลหิตวิทยาแตกต่างกัน ดังนั้นผู้ที่ เป็นพาหะโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย จะมีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงต่ำกว่า 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (-2 SD) ตามตารางที่ 8

2. **การทดสอบความเปราะของเม็ดเลือดแดงชนิดหลอดเดียว** (one tube osmotic fragility หรือ OF) โดยเม็ดเลือดแดงของคนปกติจะแตกหมด อ่านผลเป็นลบ (negative) ในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.36% แต่พาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียจะไม่แตก (ขุ่น) อ่านผลเป็นบวก (positive) การทดสอบนี้ให้ผลบวกในพาหะของ β thalassemia หรือ α -thal 1 ห้องปฏิบัติการใดที่มีการตรวจ MCV/MCH แล้วไม่จำเป็นต้องตรวจ OF

3. **การทดสอบฮีมโกลบินไม่เสถียรโดยการตกตะกอนด้วย ดิซีไอพี** [(dichlorophenolindophenol (DCIP) precipitation test) คือ DCIP ทำให้โมเลกุลของฮีมโกลบินที่ไม่เสถียร (unstable hemoglobin) เกิดการสลายตัวและตกตะกอนหรือให้ผลบวก (positive) เช่นในกรณีของ Hb E trait, homozygous Hb E ส่วนในคนปกติจะให้ผลลบ (negative)

4. **การคัดกรองพาหะฮีมโกลบิน อี ด้วยวิธี ฮีมโกลบิน อี สกรีน** (Hb E screen) ใช้หลักการตรวจแบบ microcolumn chromatography ที่ใช้สำหรับวัดปริมาณ Hb A₂ โดยการเตรียมคอลัมน์ (anion exchange medium) สามารถคัดกรอง Hb E trait, β thalassemia/Hb E disease และ homozygous Hb E มีความไวและความจำเพาะสูง เมื่อเทียบกับ DCIP test

วิธีการ ตรวจกรอง

การตรวจยืนยันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย หลังการตรวจกรองให้ผลบวกให้ตรวจยืนยัน
ดังนี้

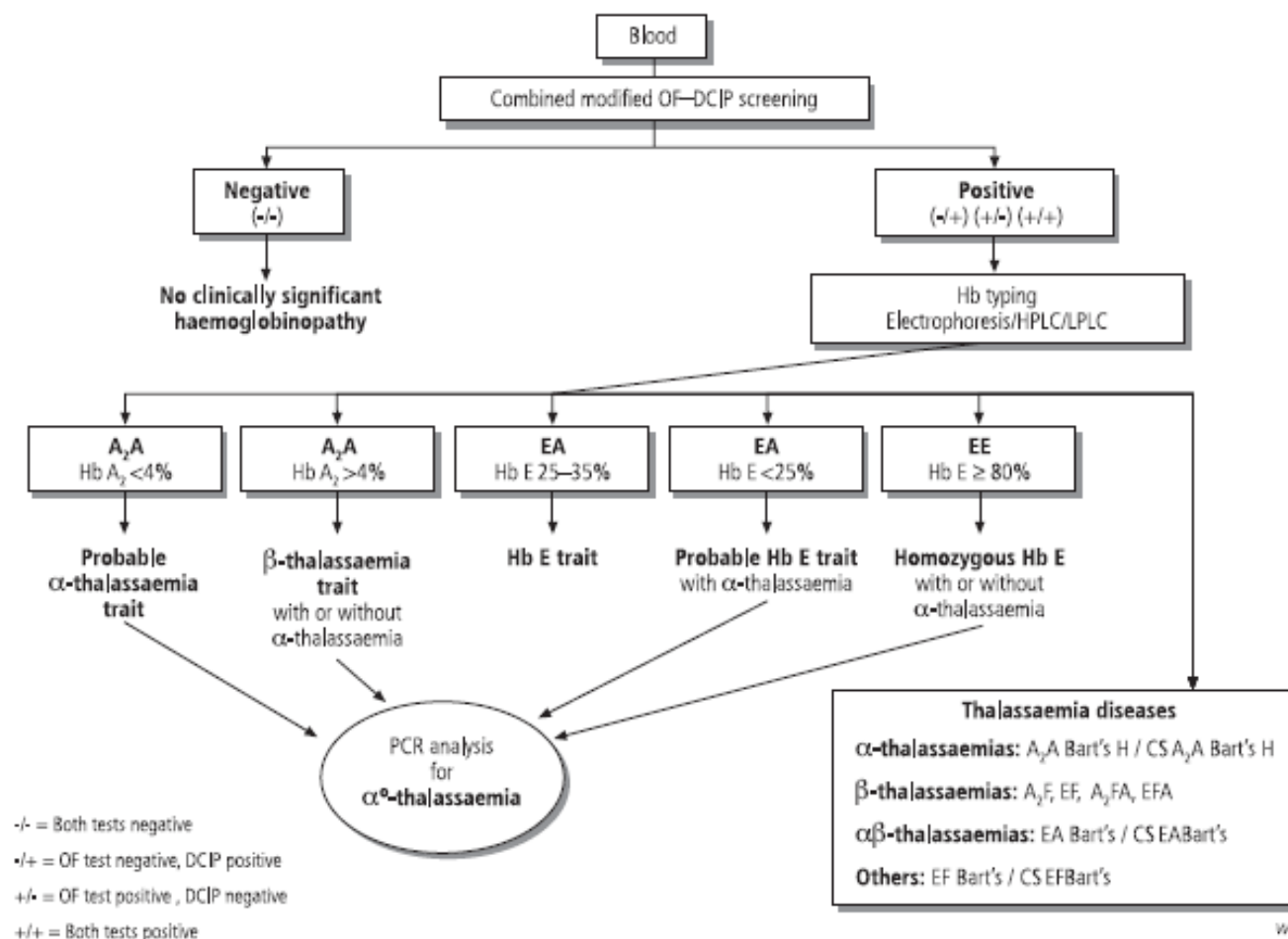
1. Hemoglobin typing สามารถให้การวินิจฉัยภาวะของ β thalassemia
โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ และฮีโมโกลบินผิดปกติแต่ละชนิดได้ ปัจจุบันมีการตรวจ
วิเคราะห์หาชนิดฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ เช่น High performance liquid
chromatography (HPLC), Low pressure liquid chromatography (LPLC) และ
Capillary electrophoresis (CE) ซึ่งสามารถให้การวินิจฉัย

- 1) ภาวะ β thalassemia โดยการตรวจวัดปริมาณ Hb A₂ จะมีค่า Hb A₂ >3.5% ผู้ที่เป็นภาวะ β thalassemia อาจจะมีภาวะ α thalassemia
ร่วมด้วย ซึ่งจะต้องตรวจยืนยันโดยการตรวจ DNA
- 2) ฮีโมโกลบินผิดปกติ ได้แก่ Hb E trait, homozygous Hb E, Hb CS
trait, homozygous Hb CS เป็นต้น ผู้ที่เป็น Hb E trait และ
homozygous Hb E อาจมีภาวะ α thalassemia ร่วมด้วย ซึ่งอาจ
ต้องตรวจยืนยันโดยการตรวจ DNA
- 3) โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย ได้แก่ Hb H disease, β thalassemia/
Hb E เป็นต้น

2. PCR (polymerase chain reaction) for α -thal 1 และ α -thal 2 ภาวะ
ตรวจหาภาวะของ α thalassemia โดยการตรวจวิเคราะห์ Gap PCR ในคนไทยพบ α -thal
1 ชนิด Southeast Asian ($-\alpha^{SEA}$) และ Thai ($-\alpha^{THAI}$) deletion ส่วน α -thal 2 พบทั้งชนิด
3.7 kb ($-\alpha^{3.7}$) และ 4.2 kb ($-\alpha^{4.2}$) deletion

วิธีการตรวจยืนยัน
หลังการตรวจกรอง

Fig. 1. Proposed screening strategy for carriers of α^0 -thalassaemia and Hb E using both the modified one-tube osmotic fragility test (OF) and the modified dichlorophenolindophenol precipitation test (DCIP) for preliminary screening



Example of Family analysis

ครอบครัวที่ 1

OF + / DCIP -

Hb 12.9 g/dl

Hct 41.4 %

MCV 65.0 fl

MCH 20.2 pg

MCHC 30.9 g/dl

Type A₂A (A₂ = 7.1%)

β^0 - thalassemia trait / α - thal 1

OF + / DCIP +

Hb 10.4 g/dl

Hct 33.7 %

MCV 72.0 fl

MCH 22.2 pg

MCHC 31.0 g/dl

Type EA

Hb E 22.4 %

Hb E trait / Homo α - thal 2

OF + / DCIP -

Hb 9.9 g/dl

Hct 27.4 %

MCV 62.2 fl

MCH 22.3 pg

MCHC 22.9 g/dl

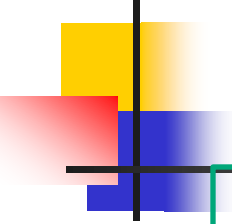
Type A₂ABart'sH

HbA₂ 1.5 %

α - thal 1 / α - thal 2

PND ?

Risk for ... β^0 - thal / Hb E disease
Others: ... Hb H disease
... EABart's disease



Lab เกี่ยวข้องกับการตรวจทั้ง 3 ระดับ

..... Screening

..... Hb typing

..... DNA analysis

**... Quality ... Effectiveness ... Interpretation ...
... Availability ... Referral system ...**

A Reliable Screening Protocol for Thalassemia and Hemoglobinopathies in Pregnancy

An Alternative Approach to Electronic Blood Cell Counting

Kanokwan Sanchaisuriya, MSc,^{1,2,4*} Supan Fucharoen, DSc,^{3,4} Goonnapa Fucharoen, MSc,^{2,4} Thawalwong Ratanasiri, MD,⁵ Pattara Sanchaisuriya, PhD,⁶ Yossombat Changtrakul, MSc,⁷ Uthai Ukosanakarn, MD,⁸ Wichai Ussawaphark, MD,⁹ and Frank P. Schelp, MD¹⁰

Key Words: Thalassemia screening; α -Thalassemia; β -Thalassemia; Hemoglobin E; Osmotic fragility test; Dichlorophenolindophenol test; RBC indices

DOI: 10.1309/FUF9EVGQ24V1PKTP

..... Screening

Abstract

Primary screening for thalassemia and hemoglobinopathies usually involves an accurate blood count using an expensive electronic blood cell counter. A cheaper alternative method was tested by using a modified osmotic fragility (OF) test and a modified dichlorophenolindophenol (DCIP) test. Altogether 423 pregnant Thai women participated in this project. Hemoglobin patterns and globin genotypes were determined using an automated high-performance liquid chromatography analyzer and polymerase chain

Thalassemia and hemoglobinopathies, the most common inherited disorders of hemoglobin (Hb) synthesis, are among the major public health problems in many areas of the world, including Southeast Asia.^{1,2} Although gene-gene interactions in this population can lead to several thalassemia syndromes, 3 targeted for prevention and control measures are homozygous α^0 -thalassemia causing the Hb Bart hydrops fetalis, homozygous β -thalassemia, and β -thalassemia/Hb E.³ Therefore, in a prevention and control program, rapid, accurate, and inexpensive screening protocols to identify carriers of α^0 -thalassemia, β -thalassemia, and Hb E, especially in a

Comparison with standard method

Table 3

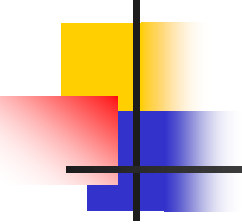
Comparison of the Effectiveness of Thalassemia and Hemoglobinopathy Screening Among 423 Pregnant Women Using Standard RBC Indices and a Combination of a Modified OF Test and a Modified DCIP Test*

	MCV <80 fL	MCH <27 pg	MCV <80 fL or MCH <27 pg	MCV <80 fL or MCH <27 pg or Positive DCIP Test	OF/DCIP
Sensitivity	72.0	78.9	81.7	100.0	100.0
Specificity	84.3	79.0	77.0	76.2	87.1
Positive predictive value	76.4	72.6	71.5	74.8	84.5
Negative predictive value	81.0	84.1	85.6	100.0	100.0

DCIP, dichlorophenolindophenol; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; OF, osmotic fragility.

* Conventional units for MCV are $<80 \mu\text{m}^3$; conventional units for MCH are the same as the Système International units given.

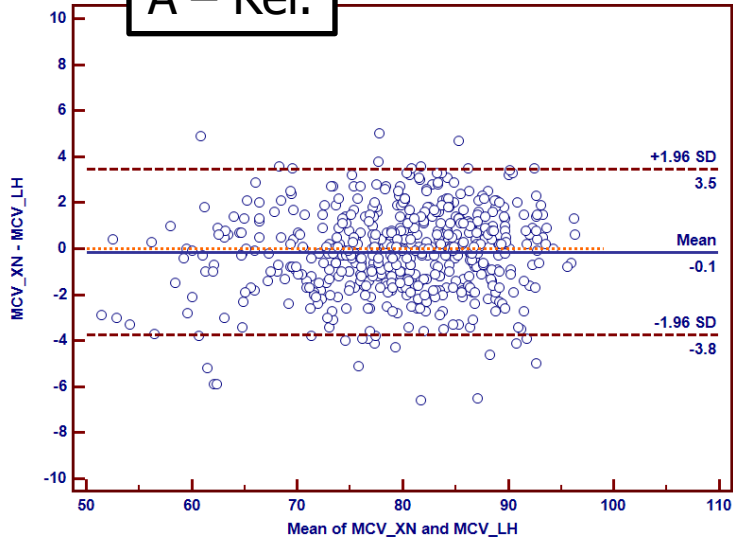
Sensitivity & Specificity : variability with selected cut – off values



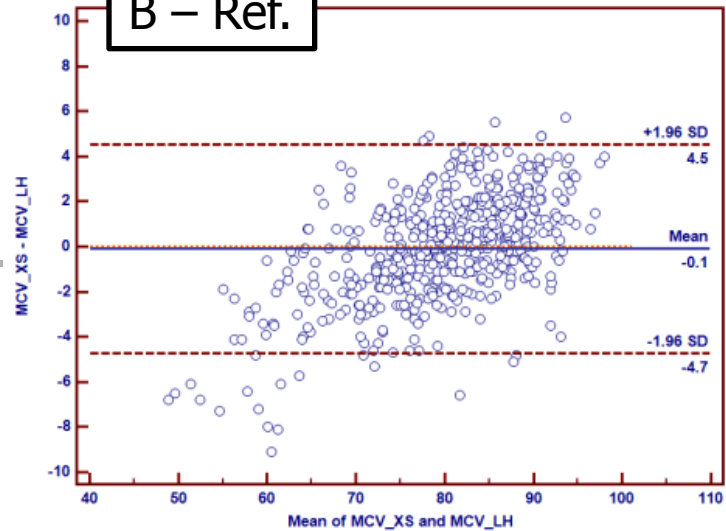
Factors affecting Sensitivity & Specificity of thalassemia screening

- **Automated blood cell counter used**
- **Prevalence & types of thalassemia in the population**
- **Cut-off values for MCV, MCH,**
- **Others ...lab skills, reagent, workload,...**

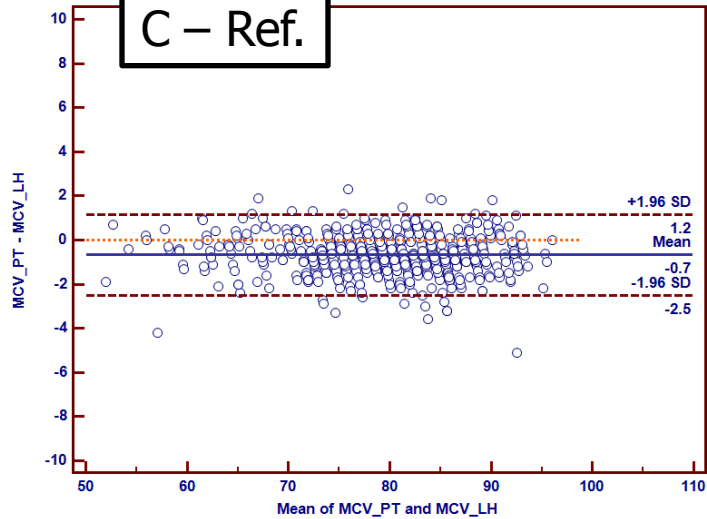
A – Ref.



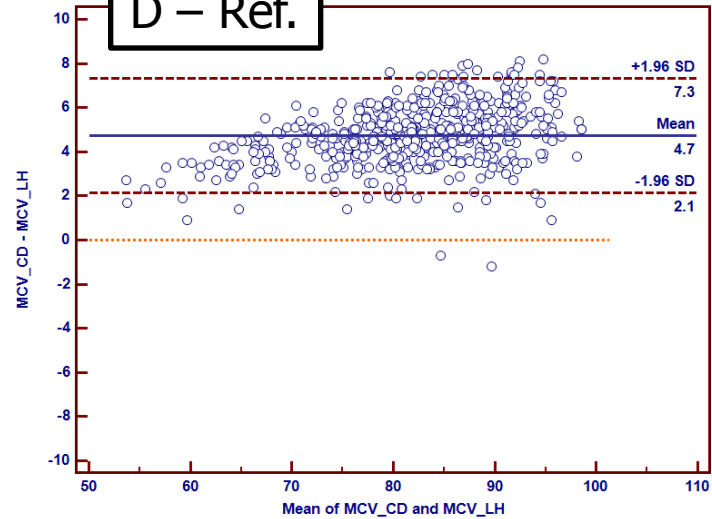
B – Ref.



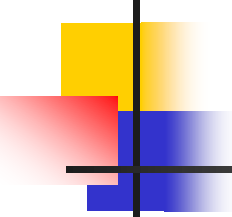
C – Ref.



D – Ref.



Comparing MCV values of different analyzers



การปรับค่า MCV & MCH ให้เหมาะสมของแต่ละโรงพยาบาล
จะช่วยให้การตรวจคัดกรอง มีความจำเพาะต่อ
 α^0 – thalassemia และ β – thalassemia มากขึ้น

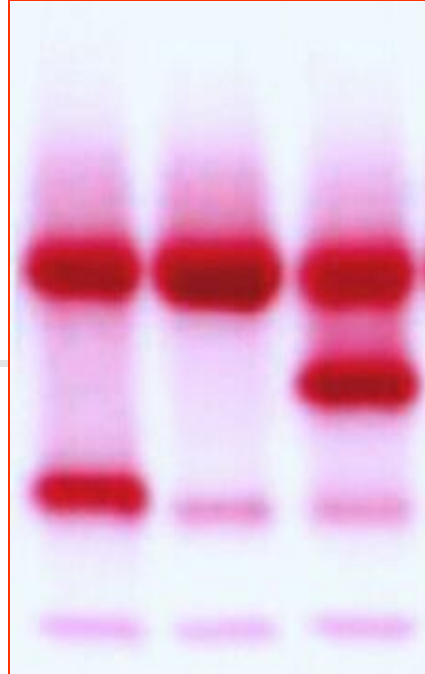


ช่วยลด work load และค่าใช้จ่ายในการส่งต่อ
เพื่อการตรวจยืนยัน

LPLC



CAE



..... Hb typing

CZE

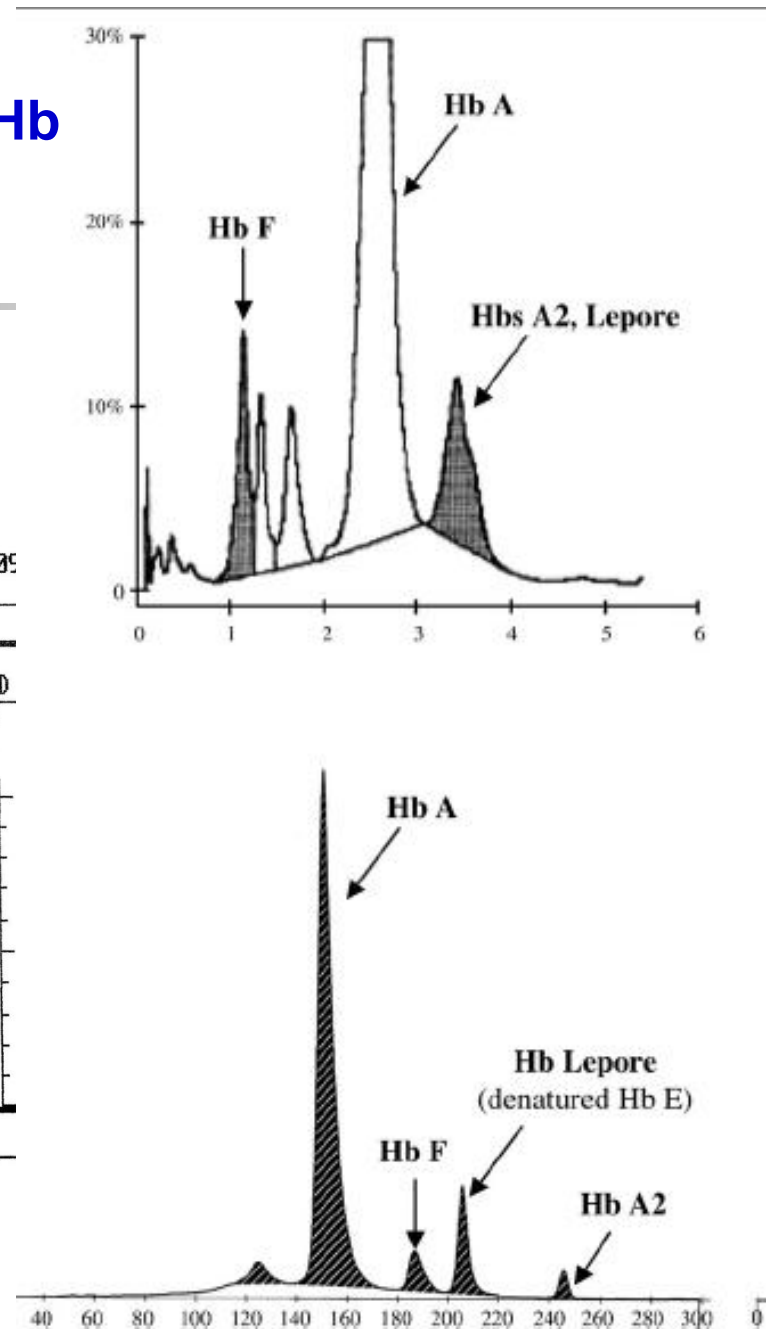
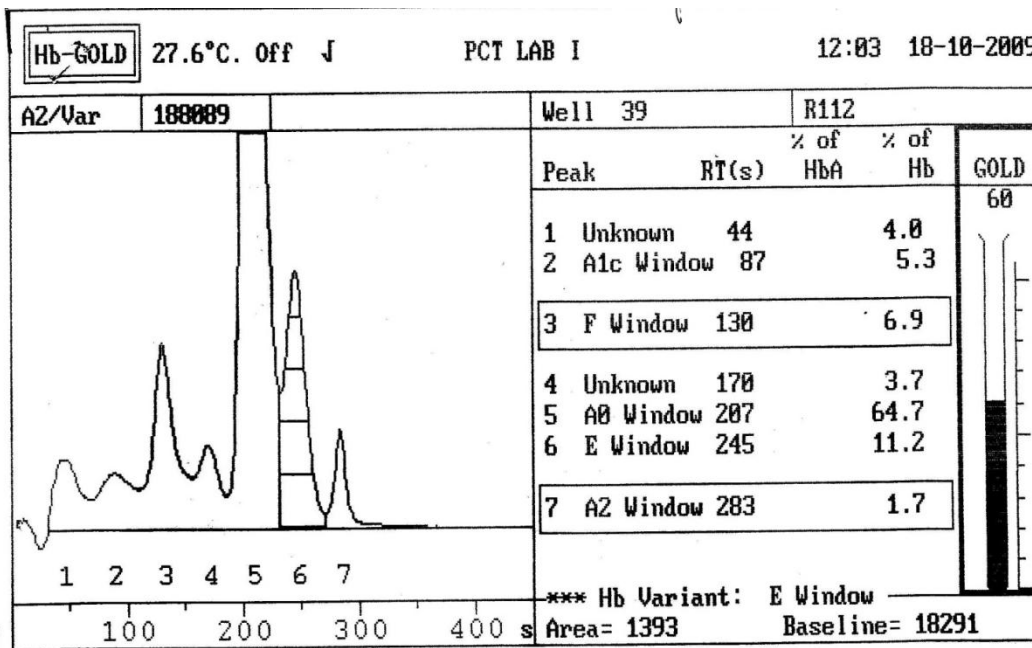


HPLC



... ใช้เครื่องตรวจ...

แต่คนทำ Lab เป็นผู้อ่านชนิดของ Hb
(... Observer dependent ...)



Prevention of severe thalassemia in northeast Thailand: 16 years of experience at a single university center

Supawadee Yamsri^{1,2}, Kanokwan Sanchaisuriya², Goonnapa Fucharoen², Nattaya Sae-ung²,
Thawalwong Ratanasiri³ and Supan Fucharoen^{2*}

¹*Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

²*Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

³*Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

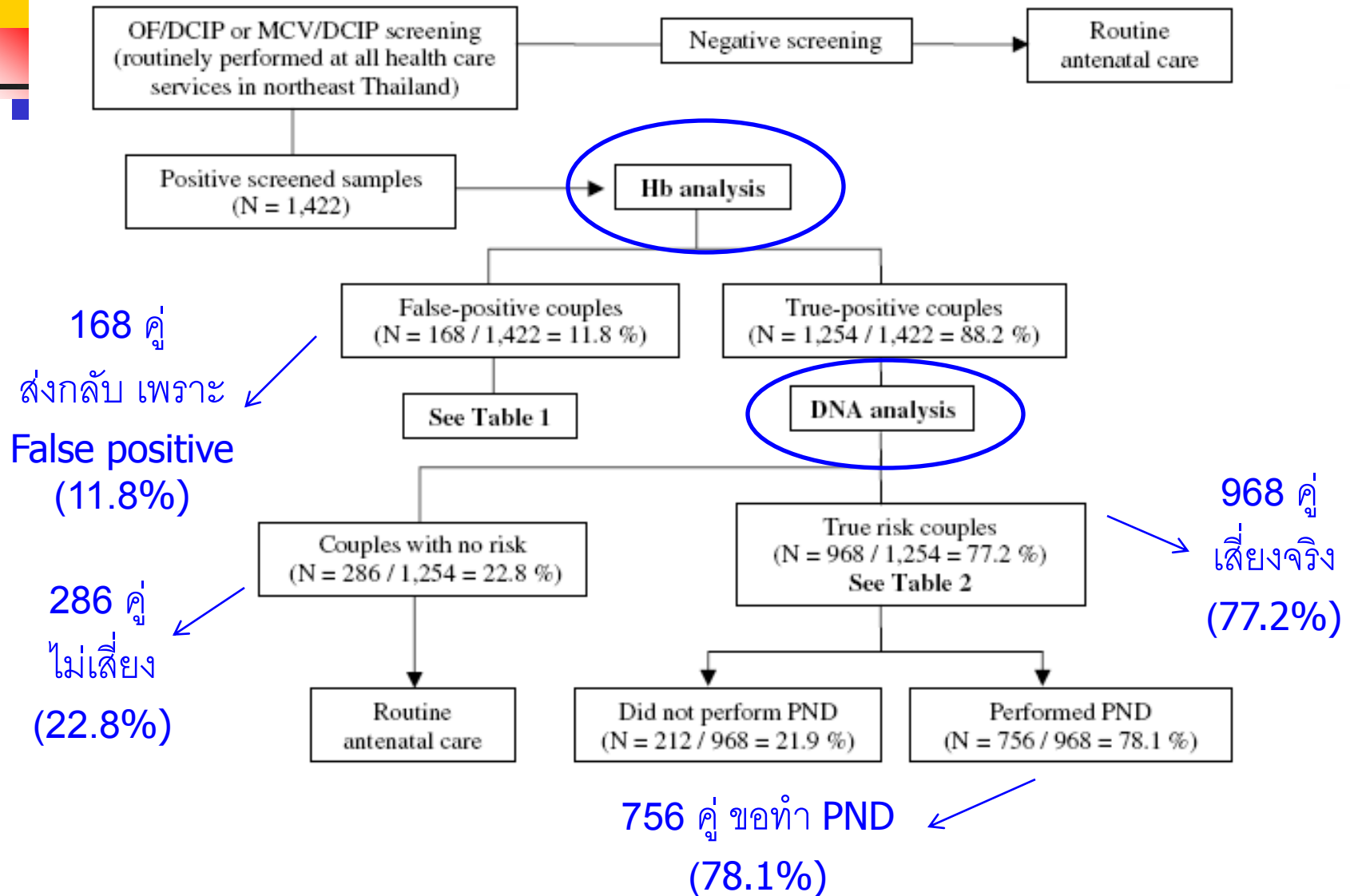
Objective To demonstrate the performance of thalassemia prevention in northeast Thailand during 1993–2008.

Methods Retrospective data from 1422 at-risk couples who attended from January 1993 to December 2008 were studied. All couples were suspected at-risk couples based on initial screening using standard protocols. Three thalassemia carrier types including α^0 -thalassemia, β -thalassemia and hemoglobin E were identified using standard methods. Data on prenatal diagnosis were collected.

Results Of the 1422 positive-screened couples, 1254 (88.2%) were diagnosed as true-positive couples. After DNA analysis, 968 of 1254 (77.2%) resulted at risk for three types of severe conditions being hemoglobin

นำข้อมูลระหว่างปี 1993 – 2008 มาวิเคราะห์
16 years of services

ข้อมูลจาก 1,422 คู่สมรสที่ส่งมาขอตรวจ



ปัญหาที่พบจากการวิเคราะห์ข้อมูล

1. False positive พบบ่อยทั้ง ๆ ที่ รพ.ส่วนใหญ่ใช้ Hb Analyzer

Table 1 —Causes of false positive-screened couples

Causes	Number (%)
Falsely high Hb A ₂	85 (50.6)
Heterozygous Hb E with Hb E >25%	78 (46.4)
Mis-diagnosis ^a	5 (3.0)
Total	168 (100)

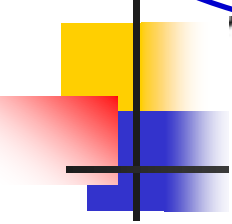
^aTwo EABart's disease misdiagnosed as β -thalassemia and three heterozygous Hb E (Hb-type: EA) misdiagnosed as Hb E- β -thalassemia (Hb-type: EFA).

.... *Improve* ได้ด้วยการจัดตั้งระบบ *EQA*

2. เจ้าหน้าที่ขาดความรู้ความเข้าใจในการแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกรคู่เสี่ยง

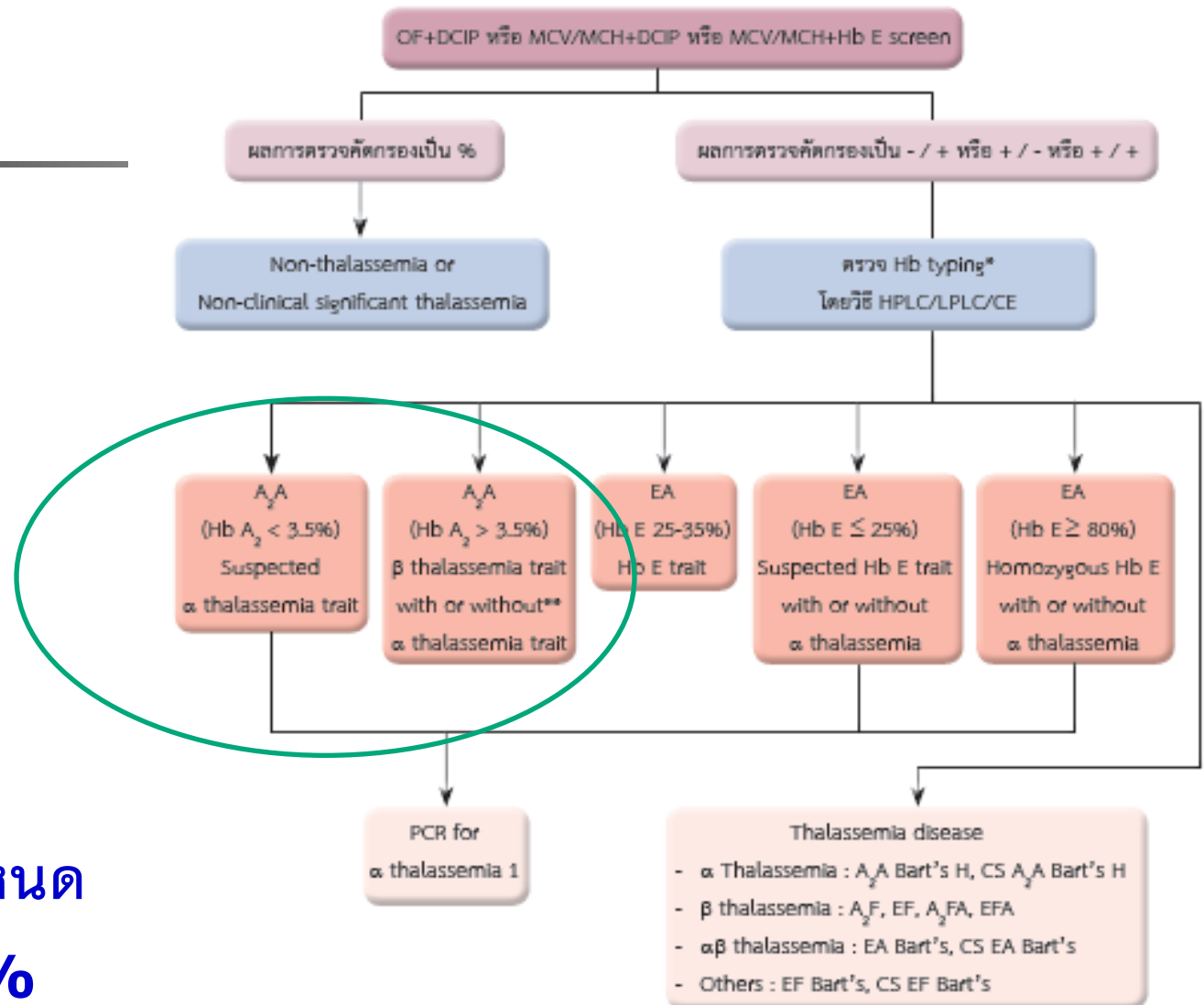
.... *Improve* ได้ด้วยการจัดประชุมฝึกอบรมผู้ที่เกี่ยวข้อง....

เน้น % Hb A₂/ E



Normal adult	:	$\leq 4 \%$
α - thalassemia trait	:	$\leq 4 \%$
β - thalassemia trait	:	$> 4 - 10 \%$
Hb E trait	:	$25 - 35 \%$
Hb E trait with α -thal 1	:	$10 - 25 \%$
Hb E homozygote	:	$\geq 80 \%$
Hb E homozygote with α -thal 1	:	$\geq 75 \%$
β -thal/HbE disease	:	$35 - 80 \%$

Fucharoen S, Fucharoen G. Songkla Med J 2545; 20 : 43-55.



Guideline กำหนด

Hb A₂ ที่ 3.5 %

... more samples to be encountered at DNA analysis...

A large cohort of β^+ -thalassemia in Thailand: Molecular, hematological and diagnostic considerations

Supawadee Yamsri^a, Kritsada Singha^{a,b}, Thanet Prajantasen^{a,b}, Wachiraporn Taweenan^a,
Goonnapa Fucharoen^a, Kanokwan Sanchaisuriya^a, Supan Fucharoen^{a,*}

^a Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

^b Medical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 13 September 2014

Accepted 13 November 2014

Available online xxxx

(Communicated by M. Narla, DSc, 13 November 2014)

Keywords:

β^+ -Thalassemia

mRNA analysis

Hb Malay

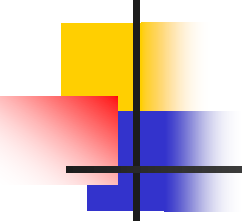
Hb Dhonburi

Thalassemia screening

ABSTRACT

We report the molecular and hematological characteristics associated with a large cohort of β^+ -thalassemia in Thailand. Study was done on 21,068 unrelated subjects referred to our center in northeast Thailand for hemoglobinopathies investigation. Among 21,068 subjects, 2637 (12.5%) were found to carry β -thalassemia. Of these 2637 cases, 705 (26.7%) carried β^+ -thalassemia with eight different mutations including 6 promoter mutations; NT-28 (A-G), NT-31 (A-G), NT-50 (G-A), NT-86 (C-G), NT-87 (C-A) and NT-90 (C-T) and two missense mutations; Hb Malay (codon 19; AAC-AGC) and Hb Dhonburi (codon 126; GTG-GGG). Hematological features of carriers with these β^+ -thalassemia ($n = 528$) were compared with those with β^0 -thalassemia ($n = 309$). Data for Hb E- β^+ -thalassemia ($n = 177$) were also presented along with Hb E- β^0 -thalassemia in our series ($n = 94$). All

Total 21,068 subjects examined
2,637 β - thalassemia carriers
1,932 β^0 - thalassemia (73.3%)
705 β^+ - thalassemia (26.7%)



β^0 – **thalassemia** : Severe

β^+ - **thalassemia** : Mild

Similar hematological characteristics i.e.

Low MCV

Low MCH

Elevated Hb A₂

Differential diagnosis is only made possible by
DNA analysis

... ตรวจหา **mutation** ในคู่สมรสก่อนส่งไปทำ **PND** น่าจะดีกว่า ...

β^+ - thalassemia mutations observed

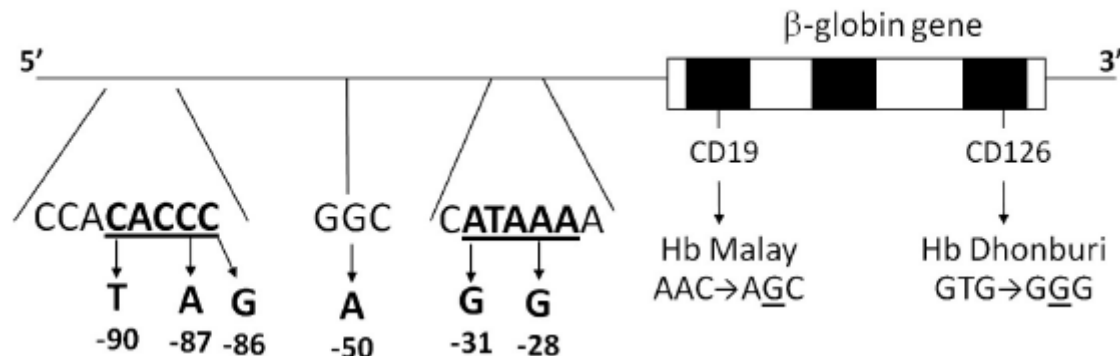


Table 1
Hematological parameters and Hb profiles of 528 β^+ -thalassemia heterozygotes. Values are presented as mean $\pm$ SD (min-max) or as raw data where appropriate.

β -Thal genotypes	n (%)	Sex (n) female/male	Hb A ₂ (%)	Hb F (%)	Rbc ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	RDW (%)
$\beta^{NT-28; (A-G)}/\beta^A$	431 (81.6)	225/206	5.7 $\pm$ 0.6 (3.6–7.5)	1.7 $\pm$ 1.5 (0–9.4)	5.3 $\pm$ 0.7 (3.8–7.8)	12.5 $\pm$ 1.9 (8.1–16.9)	72.1 $\pm$ 5.3 ^a (56.3–89.0)	23.3 $\pm$ 1.8 ^a (18.1–29.9)	15.3 $\pm$ 2.2 (10.7–23.4)
$\beta^{NT-31; (A-G)}/\beta^A$	41 (7.8)	23/18	4.7 $\pm$ 0.4 (3.9–5.2)	1.2 $\pm$ 1.1 (0.2–3.9)	5.0 $\pm$ 0.7 (3.7–6.2)	12.9 $\pm$ 1.5 (10.4–16.1)	77.4 $\pm$ 4.5 ^a (67.7–85.0)	25.4 $\pm$ 1.3 ^a (23.0–28.1)	14.7 $\pm$ 1.2 (12.5–16.2)
β^{Malay}/β^A	29 (5.5)	12/17	4.4 $\pm$ 0.4 (3.5–5.2)	1.3 $\pm$ 1.4 (0–5.2)	5.3 $\pm$ 0.9 (3.8–6.5)	12.0 $\pm$ 1.6 (9.4–14.6)	70.2 $\pm$ 5.1 ^a (61.9–82.6)	23.4 $\pm$ 2.5 ^a (19.7–31.3)	15.6 $\pm$ 1.8 (13.5–18.8)
$\beta^{NT-87; (C-A)}/\beta^A$	13 (2.5)	9/4	5.6 $\pm$ 0.5 (5.4–6.3)	3.2 $\pm$ 2.1 (1.2–8.4)	5.5 $\pm$ 0.7 (4.5–6.4)	13.3 $\pm$ 1.4 (11.4–15.3)	74.9 $\pm$ 3.1 (70.0–78.0)	24.4 $\pm$ 1.4 (22.6–26.1)	13.5 $\pm$ 0.6 (13.0–14.4)
$\beta^{Dhonburi}/\beta^A$	10 (1.9)	5/5	4.5 $\pm$ 0.3 (4.1–4.9)	0.5 $\pm$ 0.4 (0–1.0)	5.3 $\pm$ 0.7 (4.1–5.9)	13.1 $\pm$ 2.1 (10.9–15.5)	75.1 $\pm$ 4.1 (70.8–80.3)	25.2 $\pm$ 1.4 (23.4–26.6)	14.1 $\pm$ 1.1 (12.7–15.6)
$\beta^{NT-90; (C-T)}/\beta^A$	2 (0.4)	0/2	6.4, 5.9	0, 3.5	4.6, na	11.1, na	67.3, na	23.9, na	17.3, na
$\beta^{NT-86; (C-G)}/\beta^A$	1 (0.2)	1/0	5.0	0.4	na	na	na	na	na
$\beta^{NT-50; (G-A)}/\beta^A$	1 (0.2)	1/0	4.0	1.6	5.5	14.3	77.5	26	14.4
β^0/β^{Ab}	309	157/152	5.7 $\pm$ 0.7 (4.0–7.6)	1.4 $\pm$ 1.1 (0–7.0)	5.5 $\pm$ 0.9 (3.4–7.8)	11.4 $\pm$ 1.9 (10.7–17.1)	63.6 $\pm$ 4.0 ^a (55.8–77.6)	20.6 $\pm$ 1.8 ^a (18.7–25.4)	17.2 $\pm$ 2.0 (12.6–18.6)

^a Significant different from β^0 -thalassemia trait ($P < 0.001$; Mann-Whitney U-test).

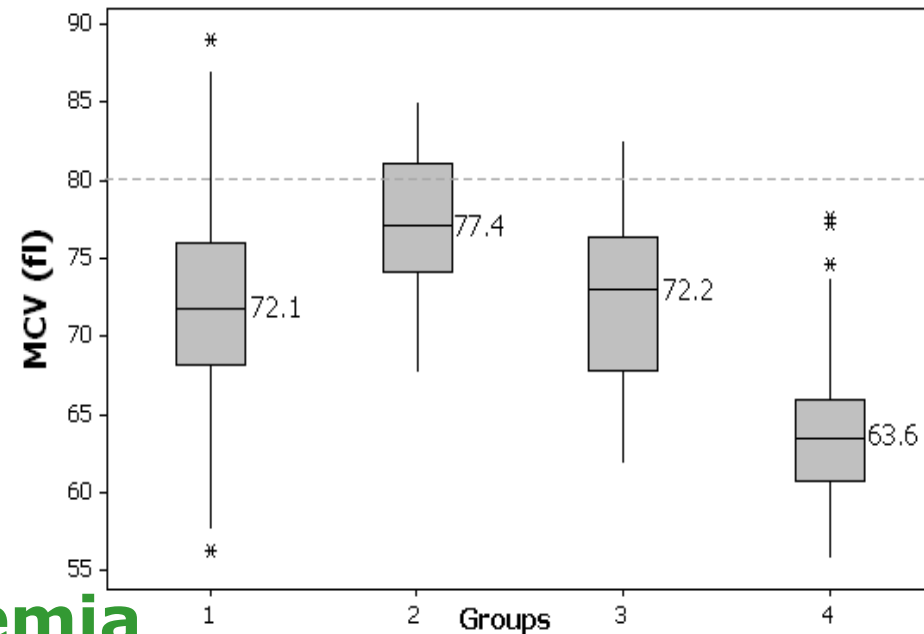
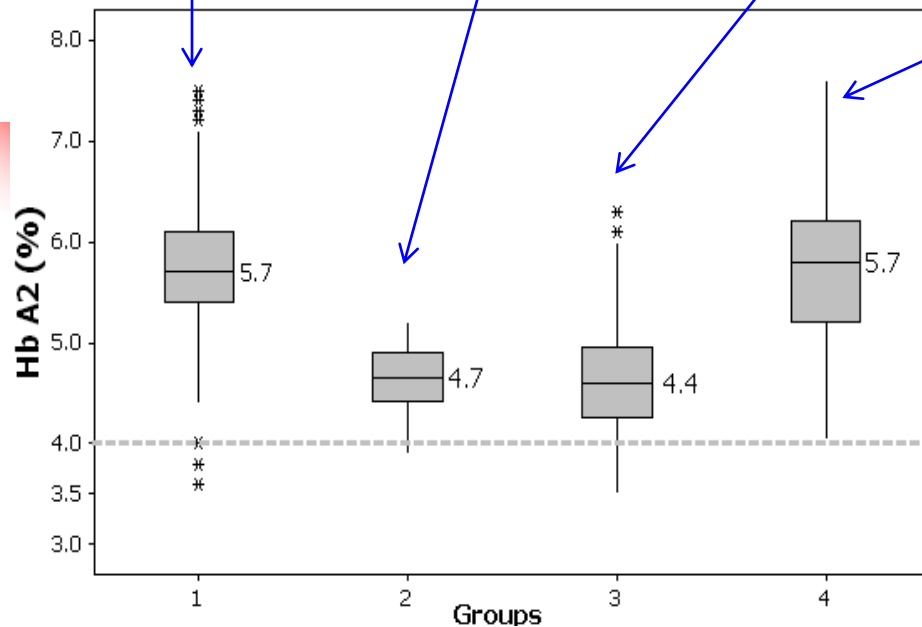
^b Heterozygous β^0 -thalassemia: Data from our series including CD 41/42 (–TTCT); (N = 195) and CD17 (A–T); (N = 114), NT: Nucleotide na: not available.

-28 A-G (431)

-31 A-G (41)

**-87 C-A (13)
Hb Malay (29)
Hb Dhonburi (10)**

β^0 - thal (n=309)

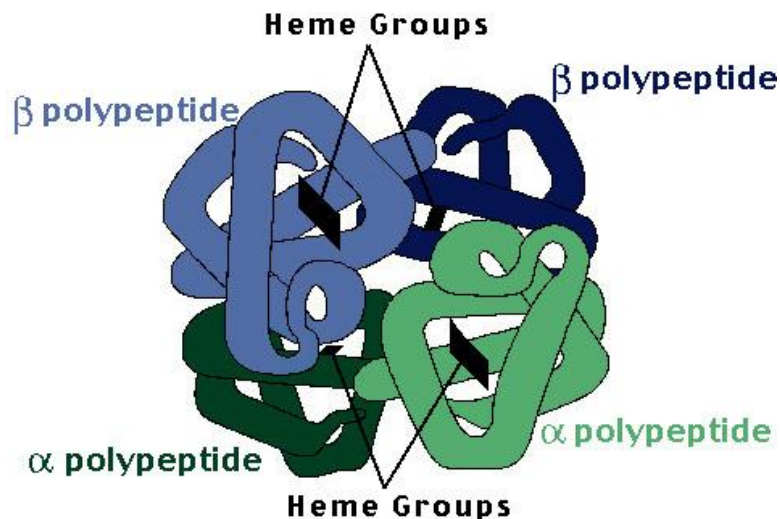


มีส่วนน้อยที่ **< 4 %**

และส่วนใหญ่เป็น **β^+ - thalassemia**

Hb variants in Thailand: Molecular and Laboratory diagnostics

The Hemoglobin Molecule



พบ Hb variants
ได้บ่อยขึ้น
แต่วินิจฉัยไม่ได้

Lab Report Unknown Hb variant ...

A Large Cohort of Hemoglobin Variants in Thailand: Molecular Epidemiological Study and Diagnostic Consideration

Hataichanok Srivorakun¹, Kritsada Singha^{1,2}, Goonnapa Fucharoen¹, Kanokwan Sanchai:
Supan Fucharoen^{1*}

¹Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,

²Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract

Background: Hemoglobin (Hb) variants are structurally inherited changes of globin chains. Accurate diagnosis of Hb variants is important for planning of appropriate management and genetic counseling. Since no epidemiological study has been conducted before, we have investigated frequencies, molecular and hematological features of Hb variants in a large cohort of Thai subjects.

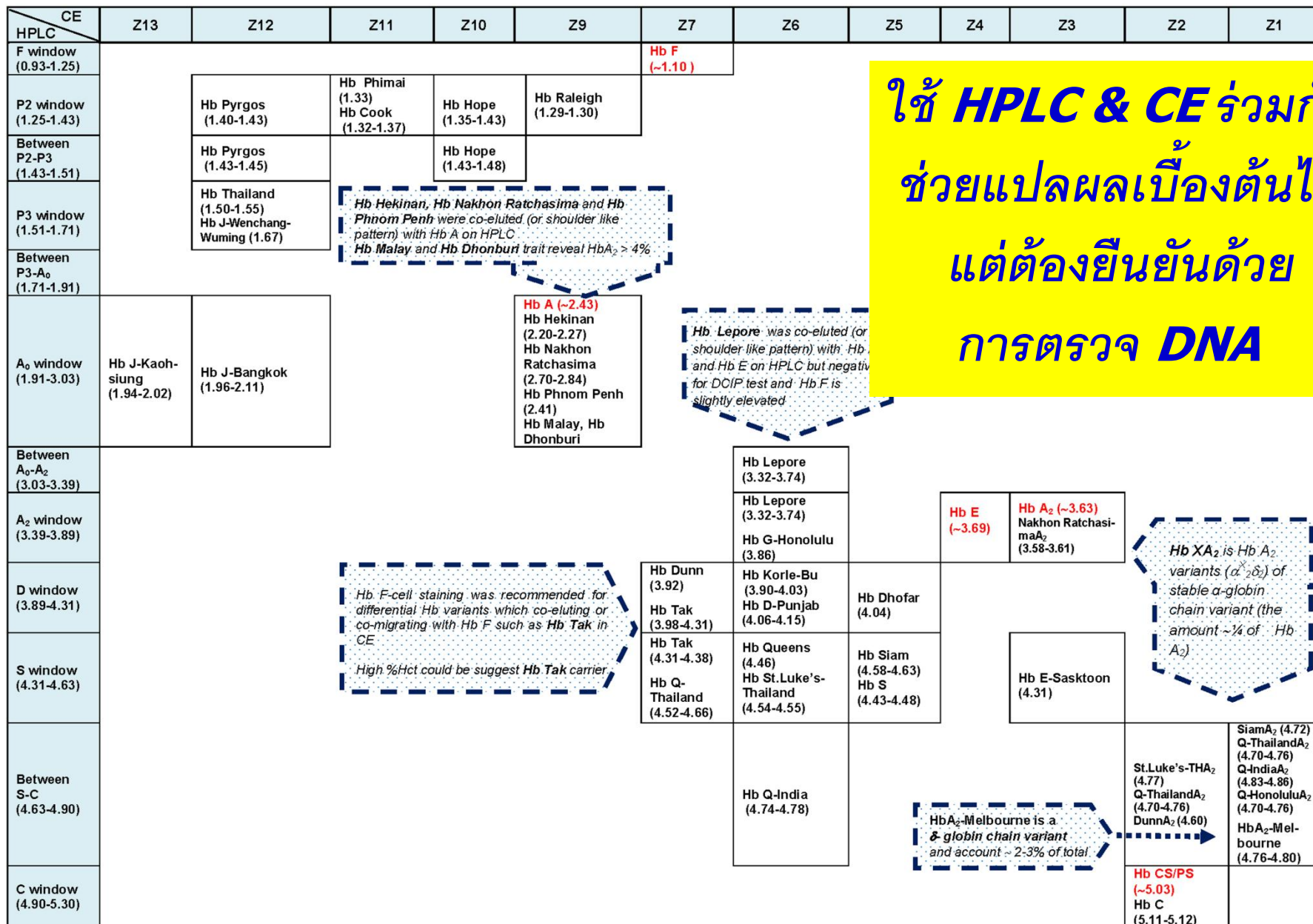
Materials and Methods: Study was conducted on 26,013 unrelated subjects, inhabiting in all geographical parts of Thailand over a period of 11 years from January 2002–December 2012. Hb analysis was done on high performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis (CE). Mutations causing Hb variants were identified using DNA sequencing techniques.

Results: Among 26,013 subjects investigated, 636 (2.4%) were found to carry Hb variants. Of these 636 subjects, 13 carried α -chain variants with 13 different mutations. The remaining included 451 (70.9%) cases with 16 β -chain variants (5.8%) cases with Hb Lepore (β β -hybrid Hb) and 6 (0.9%) cases with a single δ -chain variant. The most common α -chain variant was the Hb Q-Thailand ($\alpha^{74GAC-CAC, Asp-His}$) which was found in 101 cases (15.8%). For β -globin chain variants, Hb Hope ($\beta^{136GGT-GAT, Gly-Asp}$) and Hb Tak ($\beta^{146AAC, Tyr-Thr}$) are the two most common ones, found in 121 (18.9%) cases, respectively. Seven Hb variants have never been found in Thai population. Hb analysis profiles of these variants were illustrated to guide presumptive diagnostics.

Conclusions: Hb variants are common and heterogeneous in Thai population. With varieties of thalassemias and hemoglobinopathies in the population, interactions between them leading to complex syndromes are common. Their diagnoses are difficult in routine practices. Knowledge of the spectrum, molecular basis, genotype-phenotype and diagnostic features should prove useful for prevention and control of the diseases in the region.

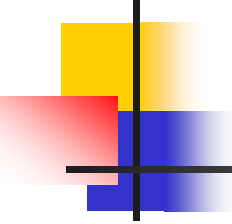


พบ ~ 40 ชนิด



ใช้ **HPLC & CE** ร่วมกัน
ช่วยแปลผลเบื้องต้นได้
แต่ต้องยืนยันด้วย
การตรวจ **DNA**

Figure 4; Srivorakun H, et al.



ให้ระวัง δ – globin chain variant ไว้บ้างก็ดี

เพื่อการรายงาน Hb A₂ มีความถูกต้องมากขึ้น

Hemoglobin, 36(1):80–84, (2012)

Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.

ISSN: 0368-0269 print/1532-432X online

DOI: 10.3109/03680269.2011.599465

informa
healthcare

SHORT COMMUNICATION

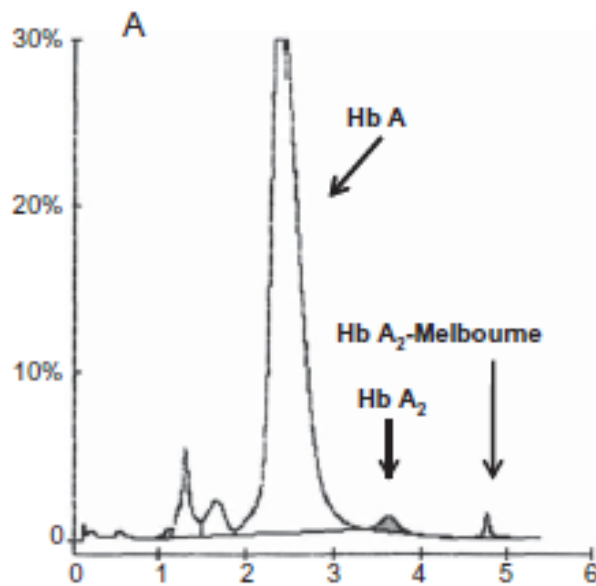
FIRST DESCRIPTION OF A Hb A₂ VARIANT IN THAILAND. IDENTIFICATION OF Hb A₂-MELBOURNE [δ 43(CD2)Glu→Lys] IN THAI INDIVIDUALS

Attawut Chaibunruang,^{1,2} Goonnapa Fucharoen,² and Supan Fucharoen²

¹*Biomedical Sciences Program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

²*Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical*

a glutamic acid to lysine substitution corresponding to Hb A₂-Melbourne [843(CD2)Glu→Lys (GAG>AAG)] originally described in an Italian family in Australia (5) but not previously described in Thailand. This Thai woman with Hb A₂-Melbourne was generally healthy and had normal hematological features: RBC 4.68 10¹²/L; Hb 12.5 g/dL; PCV 0.38 L/L; MCV 82.1 fL; MCH 26.7 pg; MCHC 32.6 g/dL and RDW 14.0%. Hemoglobin analysis identified 1.6% Hb A₂ with 0.9% Hb A₂-Melbourne on HPLC and 1.3% Hb



$$\text{Total Hb A}_2 = 1.6 + 0.9 = 2.5 \%$$

(For accurate diagnosis of
β-thalassemia trait)

... ถ้าไม่เกิน 4 % ก็แล้วไป ...



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim

Known and new hemoglobin A₂ variants in Thailand and implication for β -thalassemia screening



Sitthichai Panyasai^{a,b}, Goonnapa Fucharoen^b, Supan Fucharoen^{b,*}

^a Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Thailand

^b Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

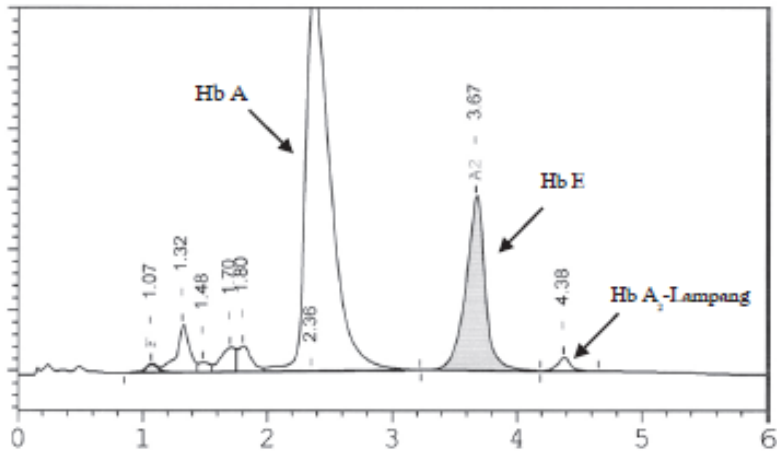
Table 1

Hematological data and globin genotypes of the patients.

Parameters	P1 (Hb A ₂ -Melbourne/ α^+ -thalassemia)	P2 (Hb A ₂ -Melbourne/ α^0 -thalassemia)	P3 (Hb A ₂ -Melbourne/ β^0 -thalassemia)	P4 (Hb A ₂ -Lampang/Hb E/ α^+ -thalassemia)
Sex-age (years)	Female-26	Female-48	Male-1	Male-30
α -Globin genotype	— $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$	— — ^{SEA} / $\alpha\alpha$	$\alpha\alpha$ / $\alpha\alpha$	— $\alpha^{3.7}$ / $\alpha\alpha$
β -Globin genotype	β^A / β^A	β^A / β^A	$\beta^{41,42}$ / β^A	β^E / β^A
δ -Globin genotype	δ^{cd43} G-A/ δ	δ^{cd43} G-A/ δ	δ^{cd43} G-A/ δ	δ^{cd47} G-A/ δ
Rbc (10^{12} /L)	na	4.6	6.0	5.7
Hb (g/dL)	12.0	9.8	10.7	14.9
Hct (%)	36.0	30.8	32.0	45.0
MCV (fL)	84.0	65.8	54.1	78.4
MCH (pg)	na	21.3	17.9	26.1
MCHC (g/dL)	na	32.5	33.1	33.4
RDW (%)	na	17.0	17.7	14.9
Hb A (%)	81.6	96.6	79.8	65.1
Hb A ₂ & Hb E (%)	1.4	1.4	3.0	21.7
Hb A ₂ variant (%)	1.4	0.8	2.2	1.2
Hb F (%)	0.9	0.6	5.4	0.8

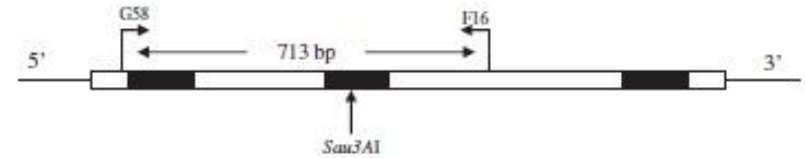
Total A₂
3.0 + 2.2

A



Identification of Hb A₂ Lampang / Hb E / α - thal 2

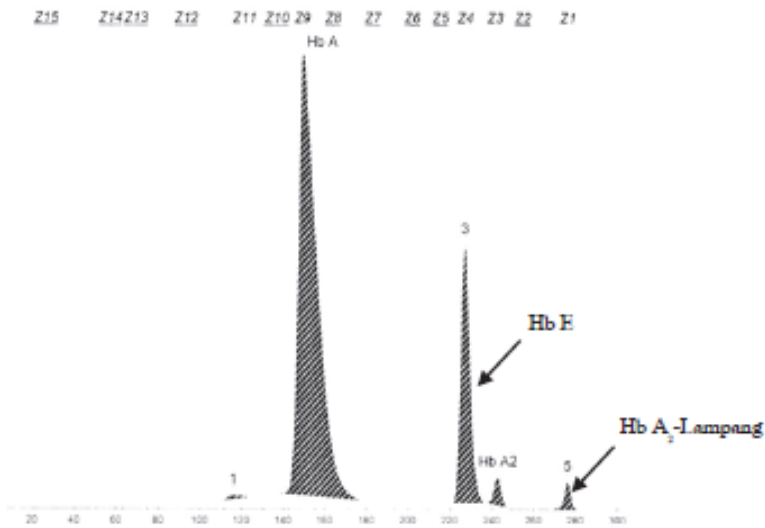
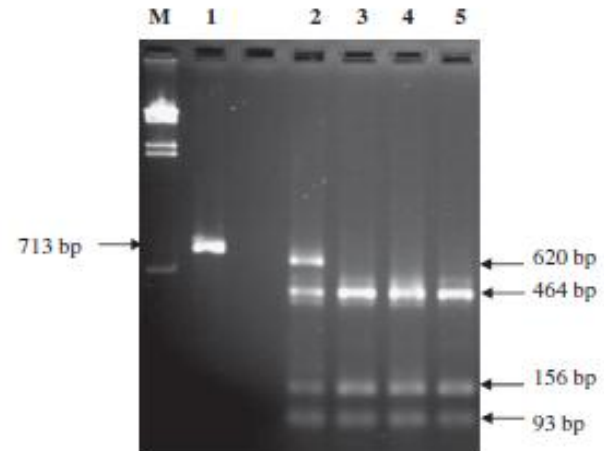
S. Panyasai et al / Clinica Chimica Acta 438 (2015) 226-230



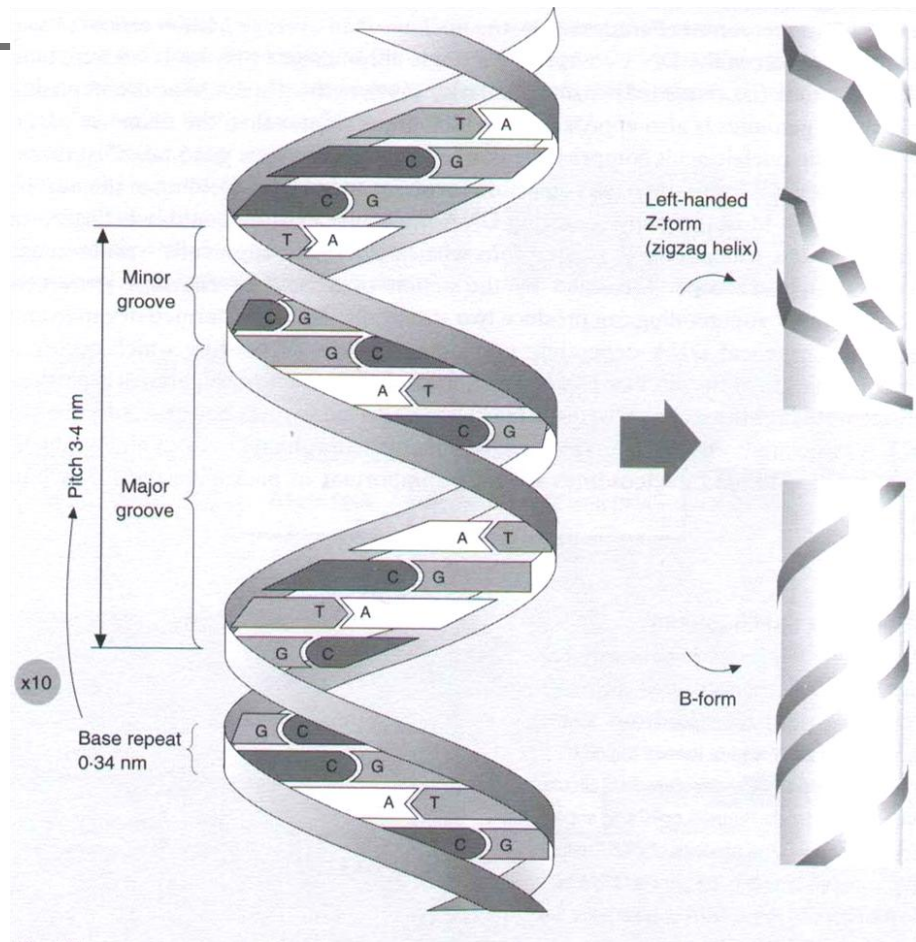
464	156	93
620		93

normal

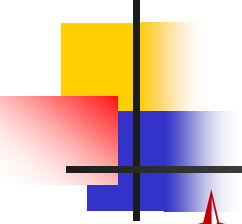
Hb A₂-Lampang



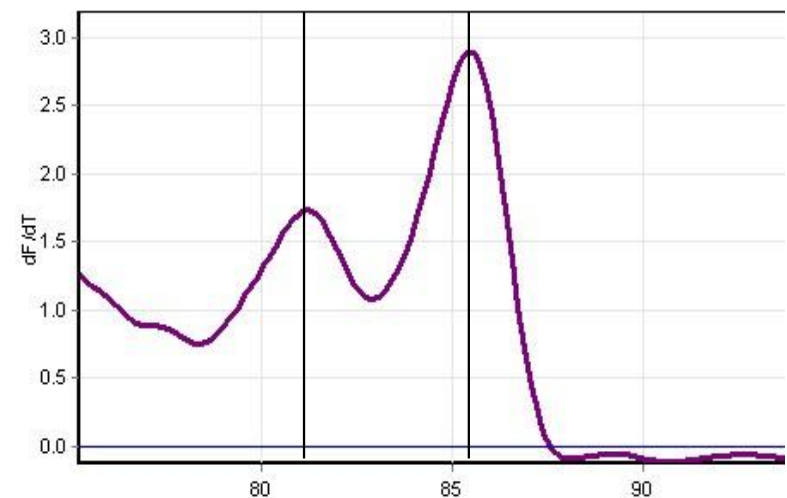
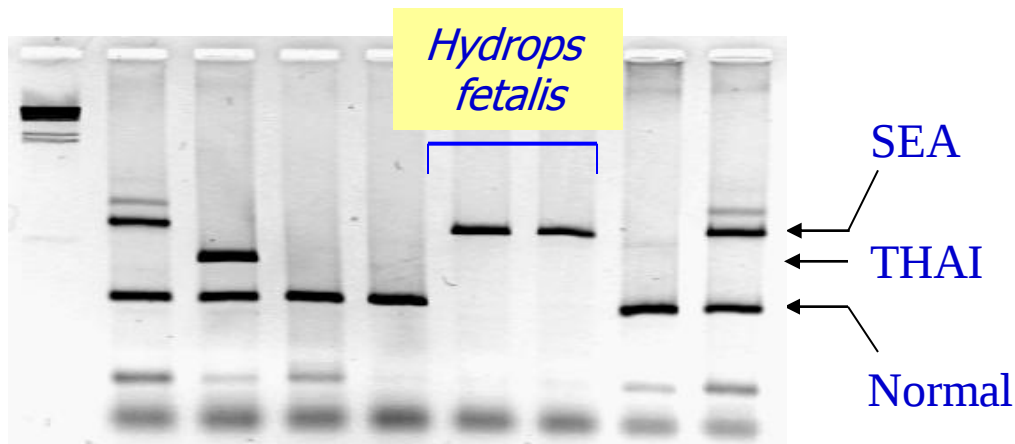
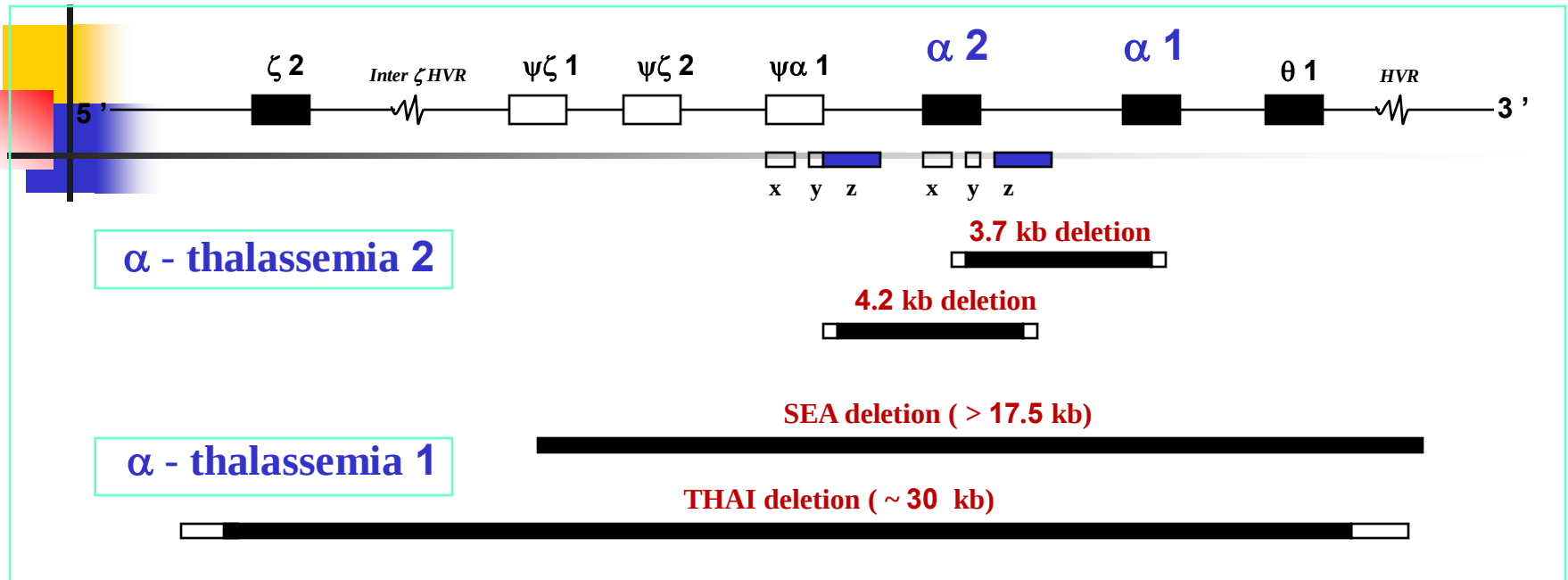
DNA analysis :-

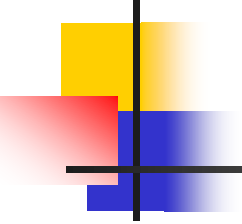


Main objectives:-

- 
- ✦ **Confirm α - thalassemia 1**
 - ✦ **β – thalassemia genotyping**
 - ✦ **Prenatal diagnosis (PND)**
 - ✦ **Diagnosis of unknown genotypes,
Hb variant, complex syndromes,...**

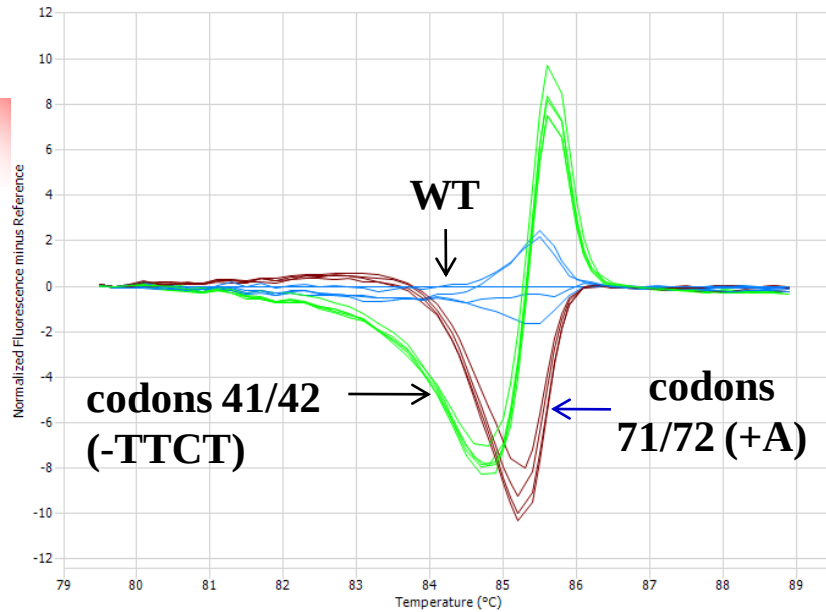
α - thalassemia in Thailand





β - thalassemia

DNA analysis in β – thalassemia

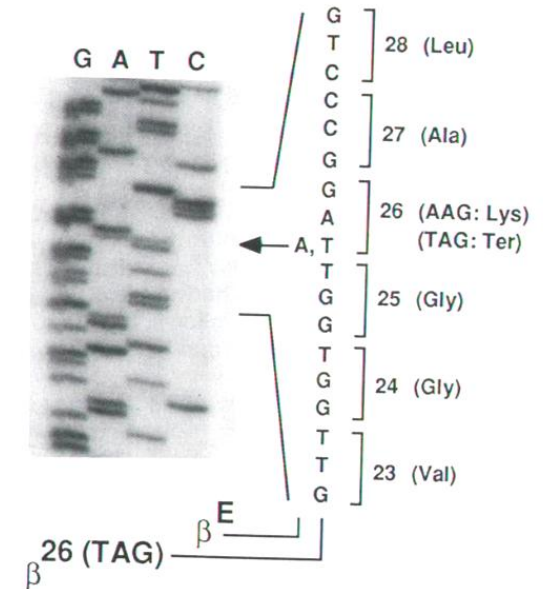
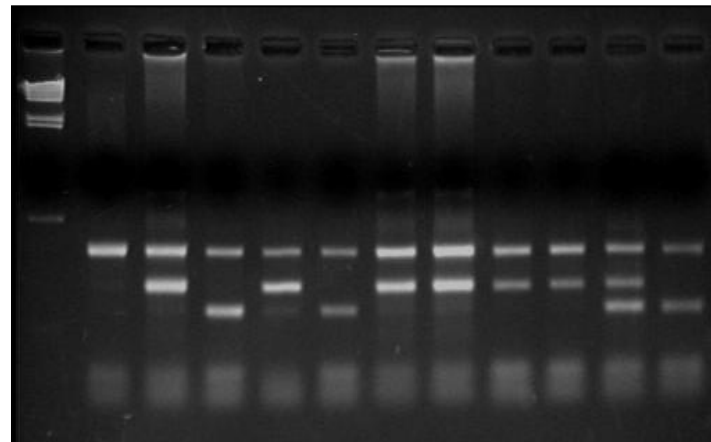
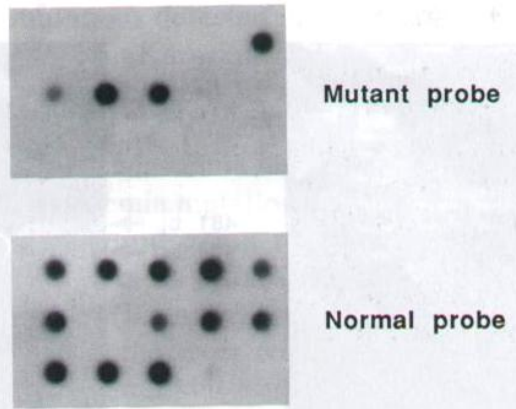
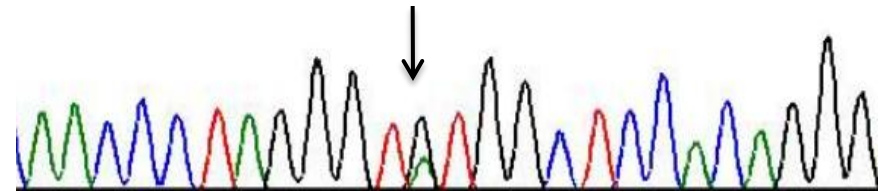


-86 -90

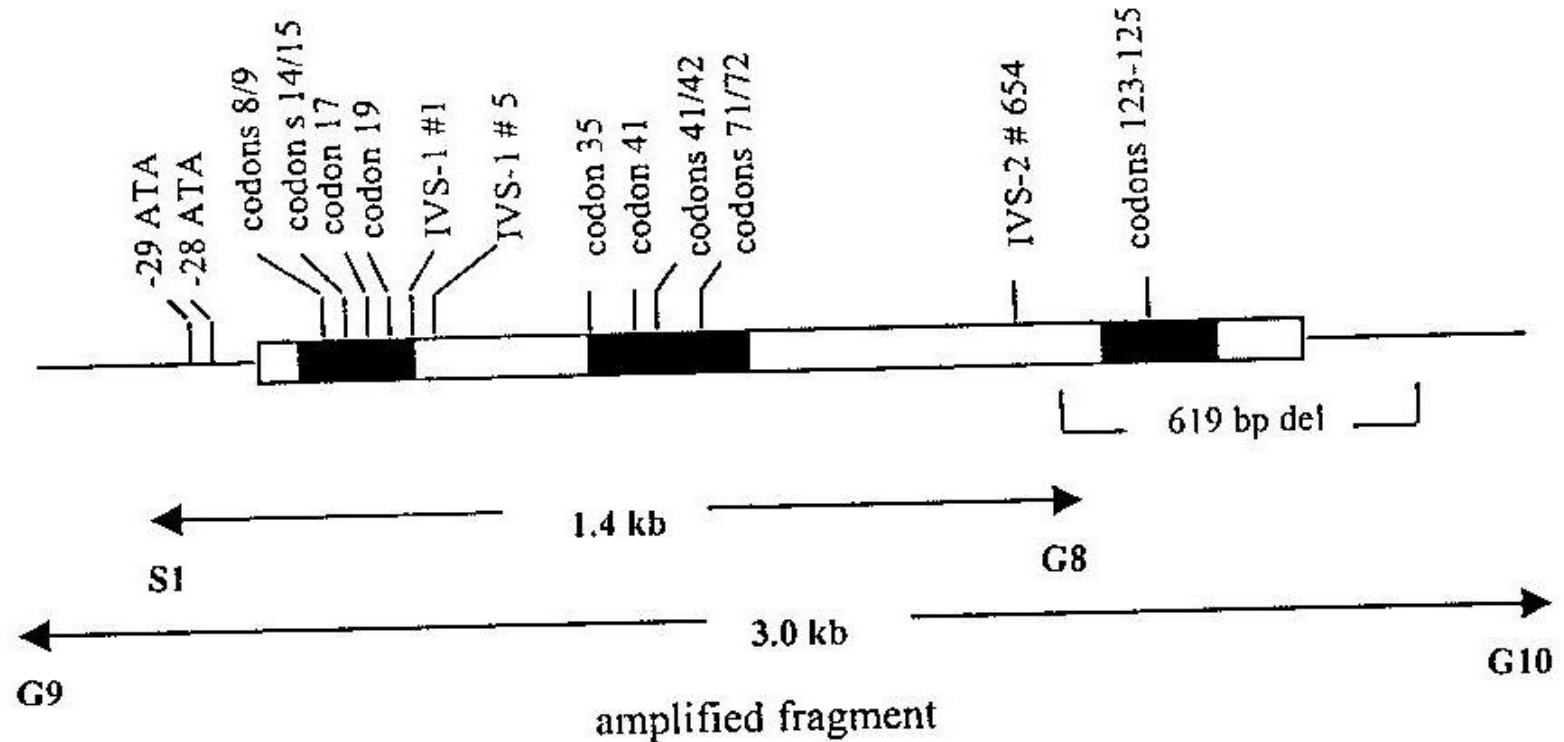
GGGATCCCA **C** ACCGAGGT

↓

GGGATCCCA **T** ACCGAGGT



β - thalassemia genes in Thailand



Mostly caused by point mutations



Molecular basis of β -thalassemia in northeast Thailand

Genotype and phenotype characterizations in a large cohort of β -thalassemia heterozygote with different forms of α -thalassemia in northeast Thailand

Supawadee Yamsri ^{a,b}, Kanokwan Sanchaisuriya ^b, Goonnapa Fucharoen ^b,
Nattaya Sae-ung ^b, Supan Fucharoen ^{b,*}

^a Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

^b Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

† heterozygotes.

β -thalassemia mutation	Type	No.	%
CD 41/42; (– TTCT)	β^0	307	36.16
CD 17; (A–T)	β^0	215	25.32
NT-28; (A–G)	β^+	191	22.50
CD 71/72; (+ A)	β^0	36	4.24
IVSI-1; (G–T)	β^0	26	3.06
IVSII-654; (C–T)	β^0	19	2.23
3.4 kb deletion	β^0	19	2.23
IVSI-5; (G–C)	β^+	14	1.65
CD 43; (G–T)	β^0	6	0.71
CD 35; (C–A)	β^0	4	0.47
CD 26; (G–T)	β^0	4	0.47
NT-87; (C–A)	β^+	2	0.24
CD 15; (– T)	β^0	2	0.24
CD 27; (+ C)	β^0	1	0.12
CD19; (A–G), Hb Malay	β^+	1	0.12
CD 95; (+ A)	β^0	1	0.12
NT-31 (A–G)	β^+	1	0.12
Total		849	100



พื้นฐานการเกิดโรคระดับโมเลกุลของบีตาธาลัสซีเมียที่จังหวัดนราธิวาส

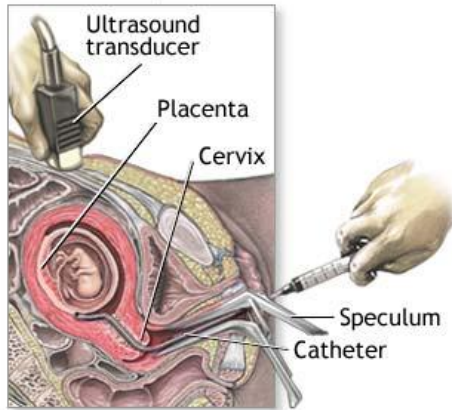
อับดุลเลาะ ทะมะ *

แต่ละภูมิภาค
ข้อมูลแตกต่างกัน

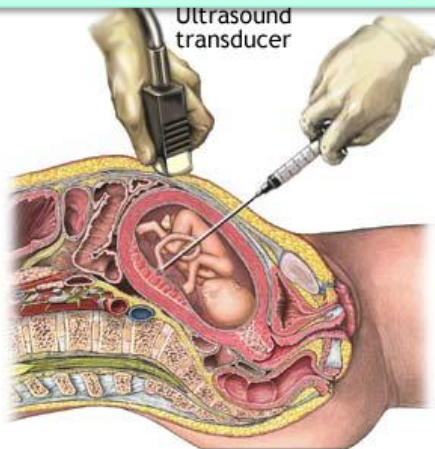
Mutation	Type	No.	%
<i>Non deletion</i>			
IVS I # 5 (G-C)	0	77	43.5
codons 41/42 (-TTCT)	0	30	16.9
codon19 (Hb Malay)	+	18	10.6
codon17 (A-T)	0	15	8.4
- 28 (A-G)	+	10	5.6
IVS I # 1 (G-T)	0	8	4.5
IVS II # 854 (C-T)	0	4	2.2
codon 41 (-C)	0	3	1.6
codons 71/72 (+A)	0	1	0.6
<i>Deletion</i>			
3.4 kb del β^0 -thalassemia	0	3	1.6
12.5 kb del $\delta\beta^0$ -thalassemia	high Hb F	3	1.6
45 kb del β^0 -thalassemia	0	2	1.1
79.2 kb del HPFH	high Hb F	2	1.1
$\alpha\gamma(\Delta\gamma\delta\beta)^0$ -thal	high Hb F	1	0.6
รวม		177	100

การวินิจฉัยทารกในครรภ์

Transcervical procedure

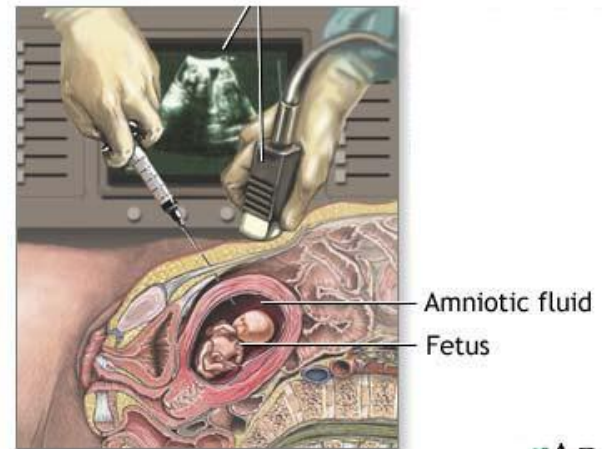


**Chorionic villus sampling / 8 – 12 GA
(23.5 %)**

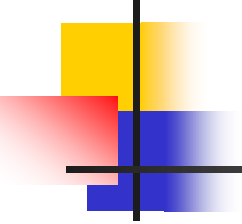


**Fetal blood / 18 -24 GA
(22.2 %)**

**Fetal
specimens
obtained at KKU**



**Amniotic fluid / 12 – 18 GA
(54.3 %)**



... **Lab** ตรวจสอบเองไม่ได้ ...

... ควรรู้ว่าจะส่งตรวจได้ที่ไหน...

... และแปลผลการตรวจได้



หน่วยบริการธาลัสซีเมีย ศวป.

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ขอเชิญผู้สนใจเข้าร่วมการประชุมเชิงปฏิบัติการ

เรื่อง “การพัฒนาทักษะการประมวลผลและแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
เพื่อการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย”

→ วันที่ 31 มกราคม 2558 เวลา 8.00 – 16.30 น. ณ โรงแรมอำนวยการสูง จังหวัดขอนแก่น



ฟรี ค่าลงทะเบียน !! สำหรับสมาชิกโครงการทดสอบความชำนาญการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
เพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย ศวป. ม.ขอนแก่น (หน่วยงานละ 1 ท่าน)
ส่วนผู้สนใจที่ไม่ได้เป็นสมาชิกโครงการ ชำระค่าอาหารว่าง+อาหารกลางวัน 350 บาท



ข้อมูลเพิ่มเติม

www.facebook.com/thaLcmdl

ด่วน!!! รับจำนวนจำกัด โดยให้สิทธิผู้ที่เป็นตัวแทนหน่วยงานสมาชิกก่อน

ส่งใบสมัครที่ e-mail : thaLcmdl@gmail.com หรือ Fax : 043-202083

ภายในวันที่ 14 มกราคม 2557



มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Khon Kaen University



Caring : ความใส่ใจ ห่วงใยต่อสังคม

ภาพเส้นใยใบไม้ แสดงถึงความห่วงใย ใส่ใจ แบ่งปันน้ำใจให้ สังคม และสิ่งแวดล้อม



Connecting : การเชื่อมโยงองค์ความรู้

ภาพลายขิดอีสาน แสดงถึงการเชื่อมโยง ส่งผ่านองค์ความรู้ เพื่อ แก้ปัญหา และพัฒนาสังคม



Creating : การทำงานอย่างสร้างสรรค์

ภาพजूईอีสานลายแสงอาทิตย์ แสงแห่งปัญญาในการสร้างสรรค์ บัณฑิต งานวิจัย และงานบริการวิชาการ



Happiness : มหาวิทยาลัยแห่งความสุข

ลายเส้นจิตรกรรมฝาผนังอีสาน เป็นภาพคน ซึ่งสื่อถึงความสุข ของ นักเรียน นักศึกษา บุคลากร ประชาชนในภูมิภาค และประชาคมโลก