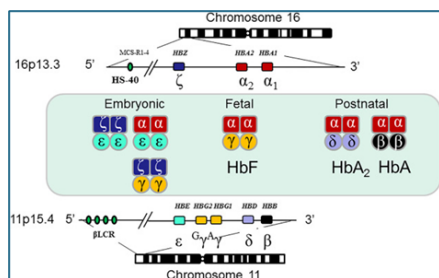


โรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย: ผู้การตรวจเชิงรุกด้วยเทคโนโลยีแม่นยำสูง

ข้อมูลโดย ดร.กิตติพงษ์ ใจสมุทร

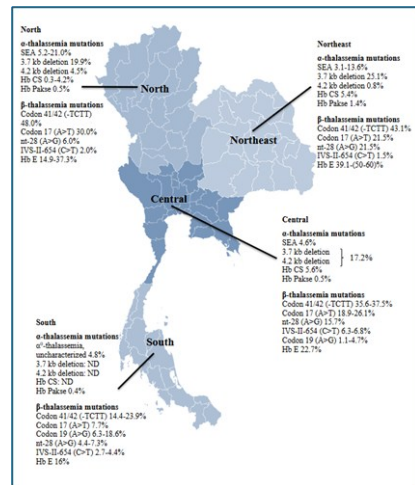
โรคธาลัสซีเมียและภาวะผิดปกติของฮีโมโกลบินเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ธาลัสซีเมียถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (autosomal recessive) มีสาเหตุมาจากความผิดปกติในการสร้าง ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง โรคธาลัสซีเมียสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ ตามชนิดของสายโกลบินคือ แอลฟา-ธาลัสซีเมีย (alpha-thalassemia) คือ โรคโลหิตจางที่เกิดจากการสร้างสายแอลฟาโกลบิน (alpha-globin chain) ลดลง ยีนแอลฟาโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างของสายแอลฟา โกลบิน ซึ่งประกอบด้วย zeta, alpha2 และ alpha1 ตามลำดับโดยผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดแอลฟา มักมีความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินแบบมีการขาดหาย (deletion) แต่ในบางรายพบว่ามี ความผิดปกติของยีนแอลฟาโกลบินแบบที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ชนิดที่สองคือ เบต้า-ธาลัสซีเมีย (beta-thalassemia) เกิดจากการสร้างสายเบต้าโกลบิน (betaglobin chain) ลดลง ยีนเบต้าโกลบินอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างของสายเบต้าโกลบิน ซึ่ง ประกอบด้วย embryonic epsilon (ϵ), delta (δ), gamma (γ) และ beta (β) ความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบินมักจะเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งในปัจจุบันมีการตรวจพบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเบต้า-ธาลัสซีเมียทั่วโลก



ภาพ 1 ตำแหน่งของกลุ่มยีนโกลบินชนิด α และ β บนโครโมโซม 16p และ 11p ตามลำดับ พร้อมแสดงชนิดของฮีโมโกลบินที่มีการสร้างในช่วงพัฒนาการต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน ระยะทารกในครรภ์ จนถึงหลังคลอด (Farashi and Hartevel 2018)

การศึกษาพบว่า 30-40% ของประชากรไทยหรือ ประมาณ 18-24 ล้านคน มียีนทางพันธุกรรมที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ โดย 20-30% เป็นพาหะธาลัสซีเมีย (thalassemia carrier) ชนิดแอลฟา-ธาลัสซีเมีย และ 3-9% เป็นพาหะเบต้า-ธาลัสซีเมีย นอกจากนี้ยังมีฮีโมโกลบินผิดปกติ (hemoglobinopathy) ที่พบบ่อยอีก 2 ชนิด คือฮีโมโกลบินอี (HbE) และ ฮีโมโกลบินคอนสแตนต์ สปริง (Hb Constant

Spring, CS) ในแต่ละปีพบการตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อโรคธาลัสซีเมียกว่า 50,000 ราย และมีทารกเกิดใหม่เป็นโรคธาลัสซีเมียราว 12,000 ราย ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตและงบประมาณระบบสาธารณสุขอย่างมหาศาล



ภาพ 2 แผนภาพการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ที่พบบ่อย (Common Mutations) ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย (Leckngam., 2023)

จากความซับซ้อนทางพันธุกรรม ผู้ความจำเป็นของเทคโนโลยี MassArray

ความท้าทายสำคัญในการควบคุมโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทยคือความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร (genetic heterogeneity) ซึ่งมีความซับซ้อนและแตกต่างในแต่ละภูมิภาค แม้ในปัจจุบันจะมีการเคลื่อนย้ายประชากรเพิ่มขึ้นแต่รูปแบบการกระจายของการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม (genetic mapping) ของประเทศไทยยังคงมีลักษณะ เฉพาะถิ่น (regional specificity) อย่างชัดเจน (ภาพ 2) ภายใต้บริบทดังกล่าว เทคโนโลยี Agena MassARRAY จึงมีบทบาทสำคัญในฐานะแพลตฟอร์มที่เอื้อต่อการพัฒนา Customized genetic panel ซึ่งสามารถออกแบบให้สอดคล้องกับลักษณะพันธุกรรมของประชากรไทยโดยเฉพาะจุดแข็งของระบบนี้อยู่ที่ความยืดหยุ่นในการเลือกตำแหน่งการกลายพันธุ์เป้าหมาย (targeted variants) ทั้งที่พบบ่อย (common mutations) และพบน้อย (rare mutations) ได้หลายตำแหน่งในหนึ่งการทดสอบครอบคลุมความต้องการโดยยังคงความแม่นยำสูง MassARRAY สามารถเป็น แพลตฟอร์มเชิงกลยุทธ์ สำหรับการสร้างโซลูชันการตรวจวินิจฉัยแบบจำเพาะประชากร (population-tailored diagnostics)

หลักการทำงานของ MassARRAY

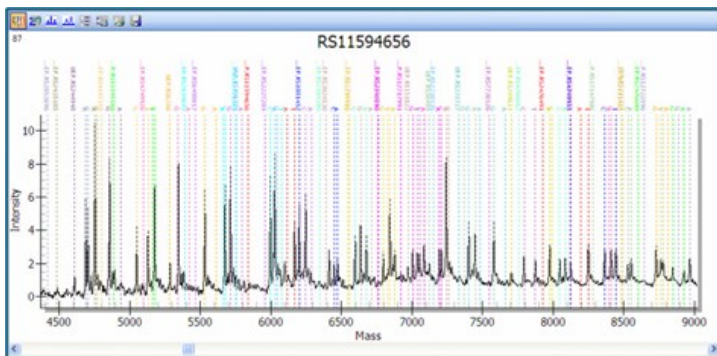
MassARRAY เป็นเทคโนโลยีการวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบ Targeted Genotyping ประสิทธิภาพสูง โดยอาศัยหลักการของ Multiplex PCR ที่ผสมผสานเข้ากับความละเอียดระดับโมเลกุลของ MALDI-TOF Mass Spectrometry (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) เพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสได้อย่างแม่นยำ

หลักการทำงานของเทคโนโลยีนี้คือการวัด “น้ำหนักมวลโมเลกุล” ของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วยเบสพื้นฐาน 4 ชนิด ได้แก่ Adenine (A), Cytosine (C), Guanine (G) และ Thymine (T) แต่ละเบสจะมีน้ำหนักเฉพาะตัวแตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อตำแหน่งของเบสเปลี่ยนไป เช่น การกลายพันธุ์ (SNP หรือ Variant site) หรือการขาดหาย/เกินมาของลำดับเบส (Insertion/Deletion: InDel) มวลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอก็จะเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งระบบ MassARRAY สามารถตรวจจับความแตกต่างนี้ได้ได้อย่างแม่นยำ



ภาพ 3 ความแตกต่างของมวลของสารพันธุกรรมสามารถตรวจจับได้โดยเทคโนโลยี MassARRAY

เทคโนโลยี MassARRAY® ยกระดับการทำงานในห้องปฏิบัติการด้วยซอฟต์แวร์วิเคราะห์ที่เปลี่ยนข้อมูลซับซ้อนให้เป็นผลลัพธ์ที่เข้าใจง่ายโดยการแสดงผลในรูปแบบ Spectrum Plot (Peak Spectrum) ที่ระบุตำแหน่งการกลายพันธุ์และยังมี User-Friendly Interface ไม่จำเป็นต้องเป็นเชี่ยวชาญด้าน Bioinformatics ก็สามารถใช้งานได้



ภาพ 4 สเปกตรัมพิก แสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงตำแหน่งพิกของแต่ละ Mass ทั้งหมดในการวิเคราะห์ โดยผ่านการทำ Multiplex PCR

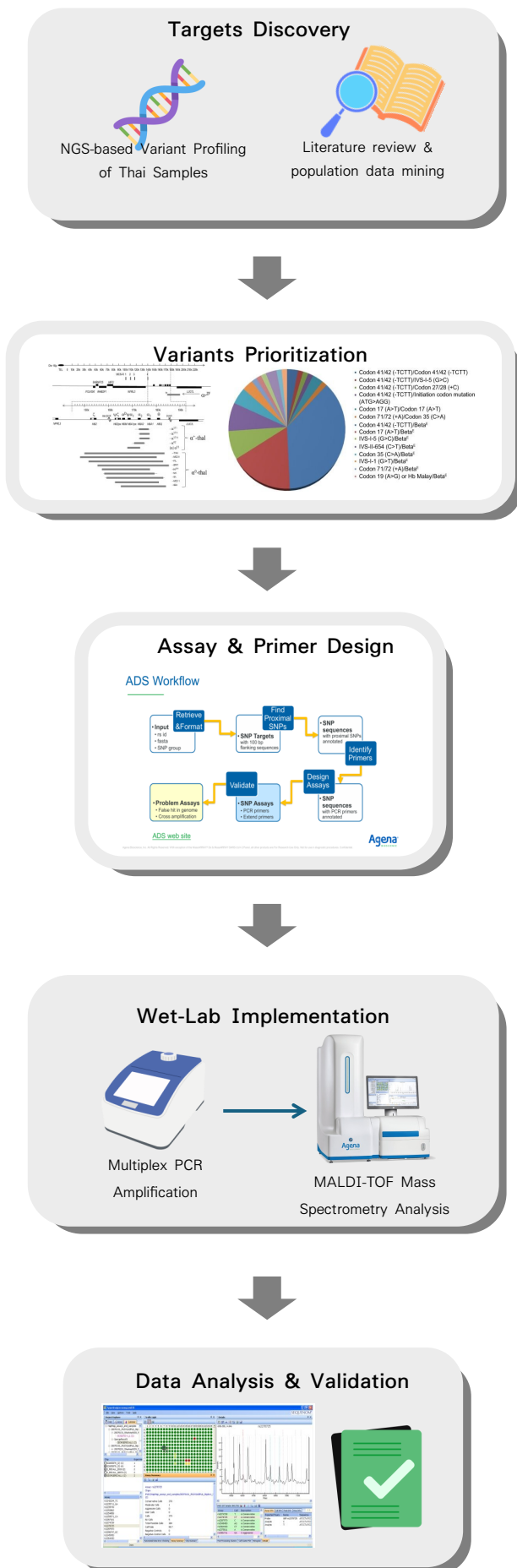
Customized Thalassemia Panel บนแพลตฟอร์ม MassARRAY®

การพัฒนาชุดตรวจโรคธาลัสซีเมียแบบปรับแต่งเฉพาะ (Customized Panel) คือหัวใจสำคัญของการวินิจฉัยเชิงรุก โดยมีขั้นตอนการออกแบบเริ่มจากการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลระบาดวิทยาจากฐานข้อมูล NGS และงานวิจัยเพื่อจัดลำดับตำแหน่งการกลายพันธุ์ตัวหลักที่มีความชุกสูงและสำคัญทางคลินิก รวมถึงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อภูมิภาคหรือประชากรไทยซึ่งมักถูกมองข้ามในชุดตรวจสำเร็จรูปจากต่างประเทศ จากนั้นทำการคัดเลือกตำแหน่งที่สนใจเพื่อออกแบบพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยใช้ซอฟต์แวร์ AGENA ASSAY DESIGN SUITE (ADS) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ช่วยคำนวณและปรับค่ามวลโมเลกุลของ Primer ให้มีความแตกต่างกันอย่างเหมาะสม เพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์แบบ Multiplex ได้สูงสุดถึง 40 ตำแหน่งภายในปฏิกิริยาเดียว ขั้นตอนต่อมาคือการนำชุดตรวจที่ออกแบบได้มาทดสอบกับตัวอย่างควบคุม (Control Materials) เพื่อยืนยันความแม่นยำ (Accuracy) และขีดจำกัดในการตรวจหา (Limit of Detection) ข้อมูลมวลโมเลกุลจะถูกประมวลผลผ่านซอฟต์แวร์ MassARRAY Typer ซึ่งทำหน้าที่ในการเรียกชนิดของจีโนไทป์ (automated genotyping) และจัดการคุณภาพข้อมูลโดยอัตโนมัติ ระบบสามารถเชื่อมต่อผลลัพธ์จากไฟล์ของเครื่อง MassARRAY เพื่อสร้าง รายงานผลแบบอัตโนมัติ (automated reporting) ได้โดยตรง พร้อมทั้งรองรับการปรับรูปแบบรายงานให้สอดคล้องกับความต้องการของห้องปฏิบัติการหรือผู้ใช้งานปลายทาง

Common mutation	Rare mutation
Beta-thalassemia	Beta-thalassemia
-28 (A->G)	-88 (C>T)
Codon 26 (G>A)	-31 (A>G)
IVSI-1 G>T	-29 (A>G)
IVS-I-5 (G>C)	IVS-I-2 (T>A)
Codons 41/42 (-TTCT)	Codon 43 (G->T)
IVS-II-654 (C>T)	Codon 15 (-T)
Codons 71/72 (+A)	Codon 95 (+A)
Codon 41 (-C)	Codons 27/28 (+C)
Codon 35 (C->A)	Codons 8/9 (+G)
Alpha-thalassemia	Alpha-thalassemia
-SEA	-3.7 kb type I
-THAI	-3.7 kb type II
-Chiang Rai (CR)	-4.2kb type I
-South Africa (SA)	-4.2 kb type II

ตาราง 1 ตัวอย่างตำแหน่งเป้าหมายในชุดตรวจโรคธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค MassARRAY

ขั้นตอนการพัฒนาชุดตรวจโรคธาลัสซีเมียแบบปรับแต่งเฉพาะ (Customized Panel) สำหรับประชากรไทย



ตาราง 2 ตัวอย่างการทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของชุดตรวจเมื่อเทียบกับ Commercial IVD kit

Sample	Commercial IVD kit	Customized panel	Specificity
S1	Del-a3.7/aa	Del-a3.7/aa	100%
S2	Del-SEA/aa	Del-SEA/aaa	100%
S3	Normal	Normal	100%
S4	Normal	Normal	100%
S5	Del-a3.7/aa	Del-a3.7/aa	100%
S6	Normal	Normal	100%
S7	Normal	Normal	100%

ความสามารถในการตรวจหายีนเสริม (Genetic Modifiers)

หนึ่งในจุดแข็งที่สุดของ MassARRAY เหนือวิธีมาตรฐานคือการนำไปใช้ตรวจ "Genetic Modifiers" ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการพยากรณ์ความรุนแรงของโรค [3] ในประเทศไทย ผู้ป่วย β -thalassemia ที่มีจีโนไทป์เดียวกันอาจมีอาการต่างกันได้มาก บางรายต้องการเลือดสม่ำเสมอ (TDT) ในขณะที่บางรายอาจมีอาการน้อย (NTDT) ปัจจัยที่กำหนดคือระดับของ Fetal Hemoglobin (HbF) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนเสริม เช่น *BCL11A*, *KLF1*, *HBG2*, *DNMT1*, *GATAD2A* และ *HBS1L-MYB* [3] การตรวจจีโนมด้วยแบบมาตรฐานมุ่งเน้นเพียงตัวแปรในยีนโกลบินหลัก (α และ β) แต่ระบบ MassARRAY สามารถรวมเอาตัวแปรในยีนเสริมเหล่านี้มากกว่า 20 ตำแหน่งเข้าไว้ในการตรวจครั้งเดียว การตรวจ modifier genes เหล่านี้ช่วยให้แพทย์สามารถประเมินระยะเวลาการอยู่รอดโดยไม่ต้องรับเลือด (Transfusion-free survival) ได้อย่างแม่นยำ

Gene	SNPs	Location *	Nucleotide change	High HbF allele	Clinical correlation
<i>BCL11A</i>	rs61749494	2:60462306	T>C	C	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [15]
<i>BCL11A</i>	rs10189857	2:60486100	A>G	A	independently associated with HbF levels [34]
<i>BCL11A</i>	rs6545816	2:60487726	A>C	A	increased HbF, fewer complications [35]
<i>BCL11A</i>	rs1427407	2:60490908	T>G	T	increased HbF, fewer complications [35]
<i>BCL11A</i>	rs7599488	2:60491212	C>T	C	independently associated with HbF levels [34]
<i>BCL11A</i>	rs766432	2:60492835	C>A	C	increased HbF, predict disease severity [36]
<i>BCL11A</i>	rs4671393	2:60493816	A>G	A	strongly associated with HbF levels [34]
<i>HMIP</i>	rs7776054	6:135097778	A>G	G	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [29]
<i>HMIP</i>	rs4895440	6:135105420	A>T	T	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [29]
<i>HMIP</i>	rs9494142	6:135110502	T>C	C	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [29]
<i>HMIP</i>	rs6934903	6:135130426	T>A	A	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [37]
<i>HBG2</i>	rs7482144	11:5254939	G>A	A	increased HbF, decreased clinical severity [38]
<i>KLF1</i>	rs137852688	19:12885335	G>C	C	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>KLF1</i>	rs387907598	19:12885338	C>G	G	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>KLF1</i>	rs483352840	19:12885316	C>T	T	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>KLF1</i>	rs483352839	19:12884952	C>T	T	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>KLF1</i>	rs483352841	19:12884973	G>C	C	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>KLF1</i>	rs483352842	19:12887128	C>T	T	increased HbF, decreased clinical severity [12]
<i>DNMT1</i>	rs1160065459	19:10148923	G>A	A	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [16]
<i>GATAD2A</i>	rs772591609	19:19465364	C>T	T	increased HbF, ameliorating β -thalassemia severity [17]

ตาราง 4 ตารางเปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและ MassARRAY สำหรับการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมีย

เปรียบเทียบ	วิธีมาตรฐาน (Conventional methods)	MassARRAY System
เทคนิคหลัก	CBC, Hb typing (HPLC/CE), Gap-PCR, ARMS-PCR, Sanger sequencing	Multiplex PCR + MALDI-TOF MS
ระดับการตรวจ	ฟีโนไทป์ + ตรวจยีนแบบจำกัดตำแหน่ง	ตรวจระดับ DNA โดยตรง (Genotyping)
จำนวนตำแหน่งที่ตรวจต่อครั้ง	ต่ำ – ตรวจได้ทีละไม่กี่ mutation	สูง – ตรวจได้หลายสิบ SNP/Indel ในครั้งเดียว
ความสามารถด้าน Multiplex	จำกัดมาก (3–7 targets/assay)	สูงมาก (10–40+ targets/assay)
ความครอบคลุมการกลายพันธุ์	เน้น common mutations	ครอบคลุมทั้ง common + rare + Thai-specific variants
ความแม่นยำ (Accuracy)	ดี แต่ขึ้นกับเทคนิคและผู้ปฏิบัติงาน	สูงมากจาก mass-based detection
Reproducibility	ปานกลาง–ดี	สูงและสม่ำเสมอ
Turnaround time	1–3 วัน (หลายขั้นตอน)	ภายใน 1 วัน สำหรับหลาย target
ต้นทุนต่อ sample	ต่ำต่อ assay แต่สูงเมื่อรวมหลายการทดสอบ	คุ้มค่าเมื่อทำแบบ multiplex
Scalability	จำกัด ต้องเพิ่ม manpower	สูง รองรับงาน screening จำนวนมาก
การปรับแต่ง panel	ทำได้ยาก ต้องพัฒนาใหม่ทุก assay	ทำได้ง่ายด้วย customized panel
เหมาะกับ	งานคัดกรองเบื้องต้น / confirm เฉพาะ mutation	งานคัดกรองเชิงโมเลกุลระดับ population / carrier screening

อ้างอิง

Farashi S, Harteveld CL. Molecular basis of α -thalassemia. Blood Cells Mol Dis. 2018 May;70:43-53. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.09.004. Epub 2017 Sep 21. PMID: 29032940

Leckngam, P. (2023). Thalassemia and Hemoglobinopathies in Thailand: A Systematic Review. *Journal of Health Science and Alternative Medicine*, 5(03), 104–113. <https://doi.org/10.14456/jhsam.2023.24>

Huang L, Zhang Q, Ye Y, Long Y, Huang H, Niu C, Lin B, Zeng L, Wang Y, Dai T, Hua X, Xu X. Rapid detection of genetic modifiers of β -thalassemia based on MALDI-TOF MS. Ann Hematol. 2025 Mar;104(3):1481-1492. doi: 10.1007/s00277-025-06277-2. Epub 2025 Feb 28. PMID: 40016399; PMCID: PMC12031963.



lifomics

บริษัท ไลโฟมิกส์ จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533



Agena[®]
BIOSCIENCE



lifomicsth



@lifomics



www.lifomics.com