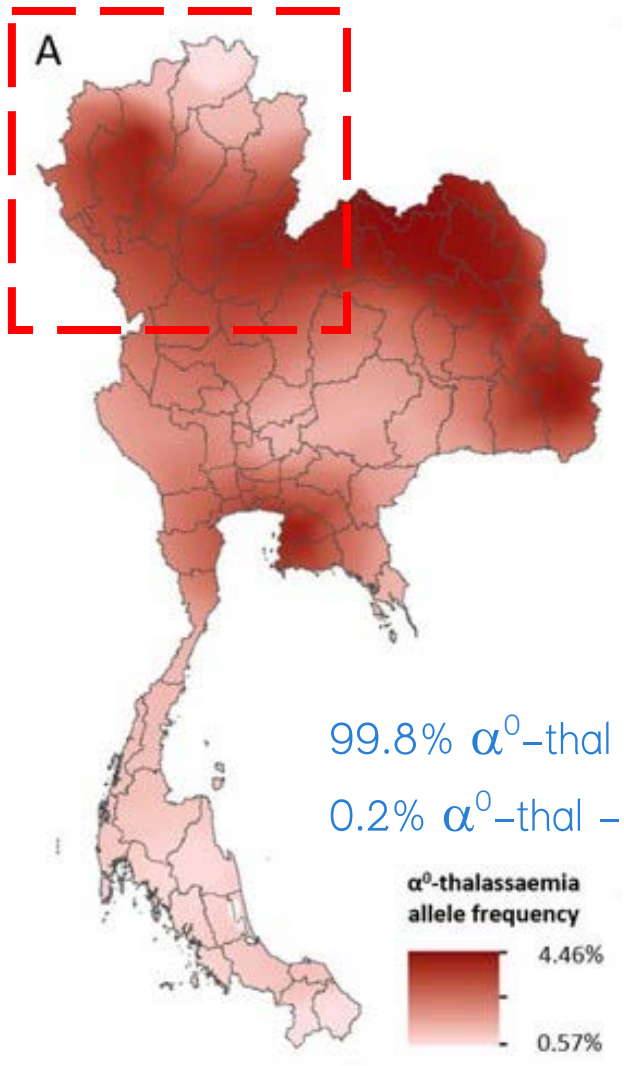
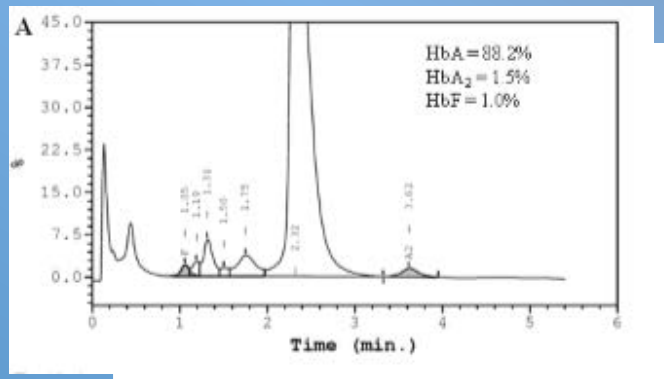
ศูนย์สุขภาพพร้อม
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
PROMPT HEALTH CENTER, AMS CMU.

การพัฒนาการตรวจ α^0–thalassemia ชนิด $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, และ $--^{CR}$ ในงานประจำวัน : งานประจำวันสู่ระดับชาติ

หน่วยธาลัสซีเมีย ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์



Hockham C, et al., eLife, 2019



Paternal sample

MCV : 69.2 fL MCH : 19.7 pg

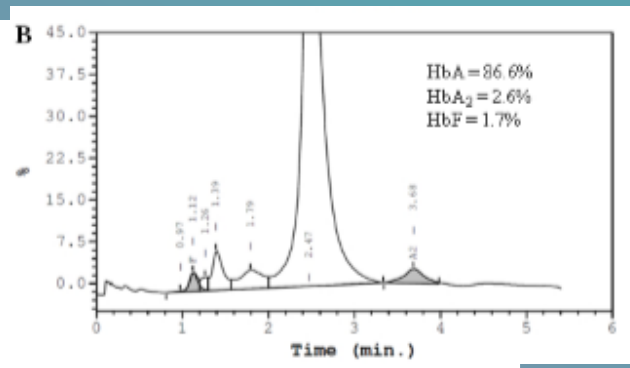
Hb Typing : A_2ABart'sH

Genotype : $--^{SEA}/-\alpha^{-3.7}$

Phenotype : deletional HbH disease

HbH disease

No risk for thal



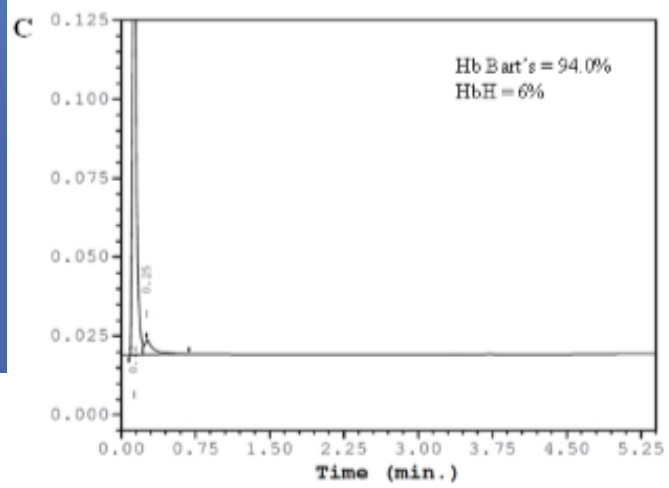
Maternal sample

MCV : 64.8 fL MCH : 20.3 pg

Hb Typing : A_2A

Genotype : $--/\alpha\alpha$ (Unknown type)

Phenotype : Unknown α^0–thal carrier



Suspected
Bart's hydrops fetalis

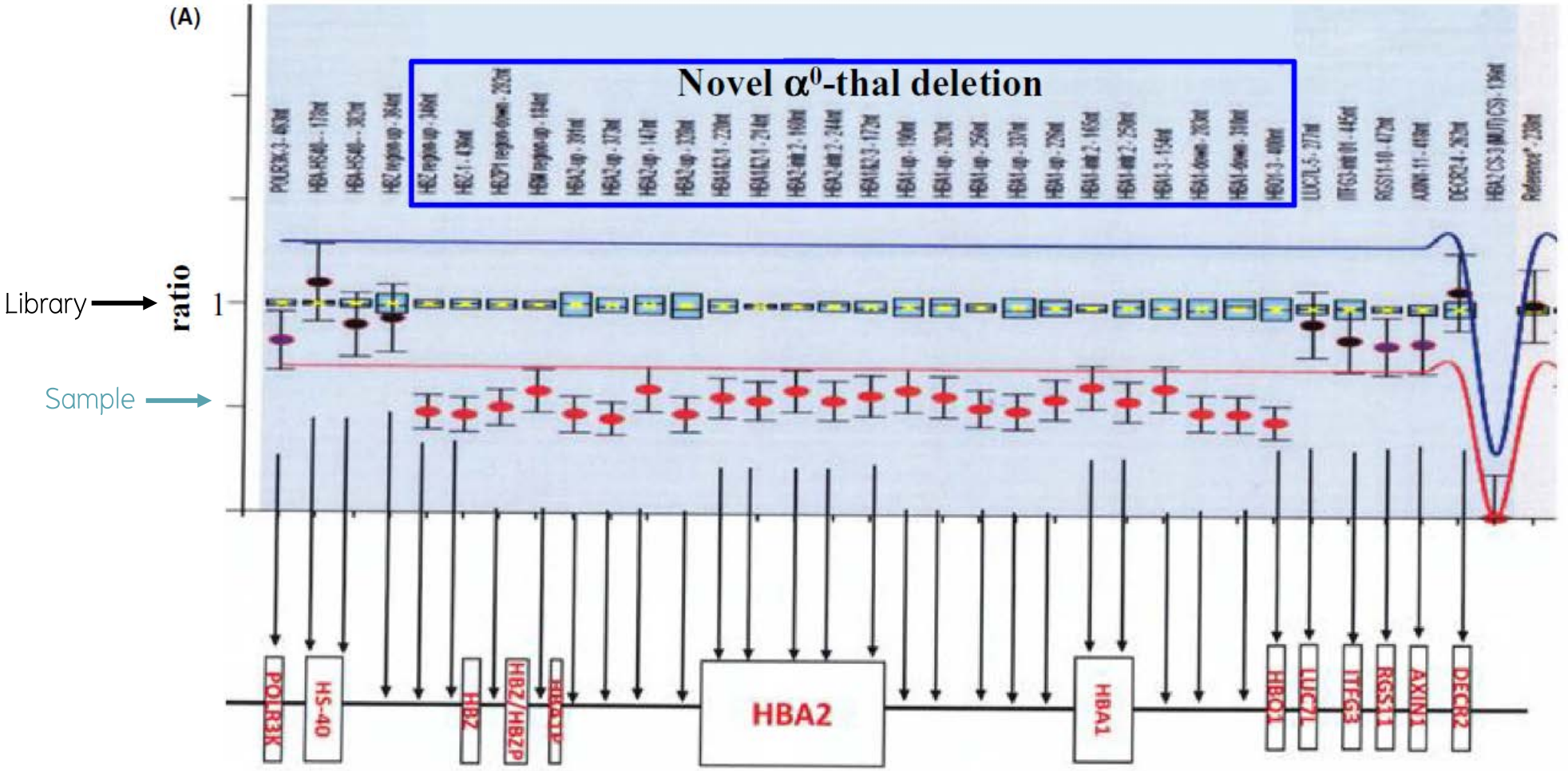
Fetal sample

Hb Typing : Bart'sH

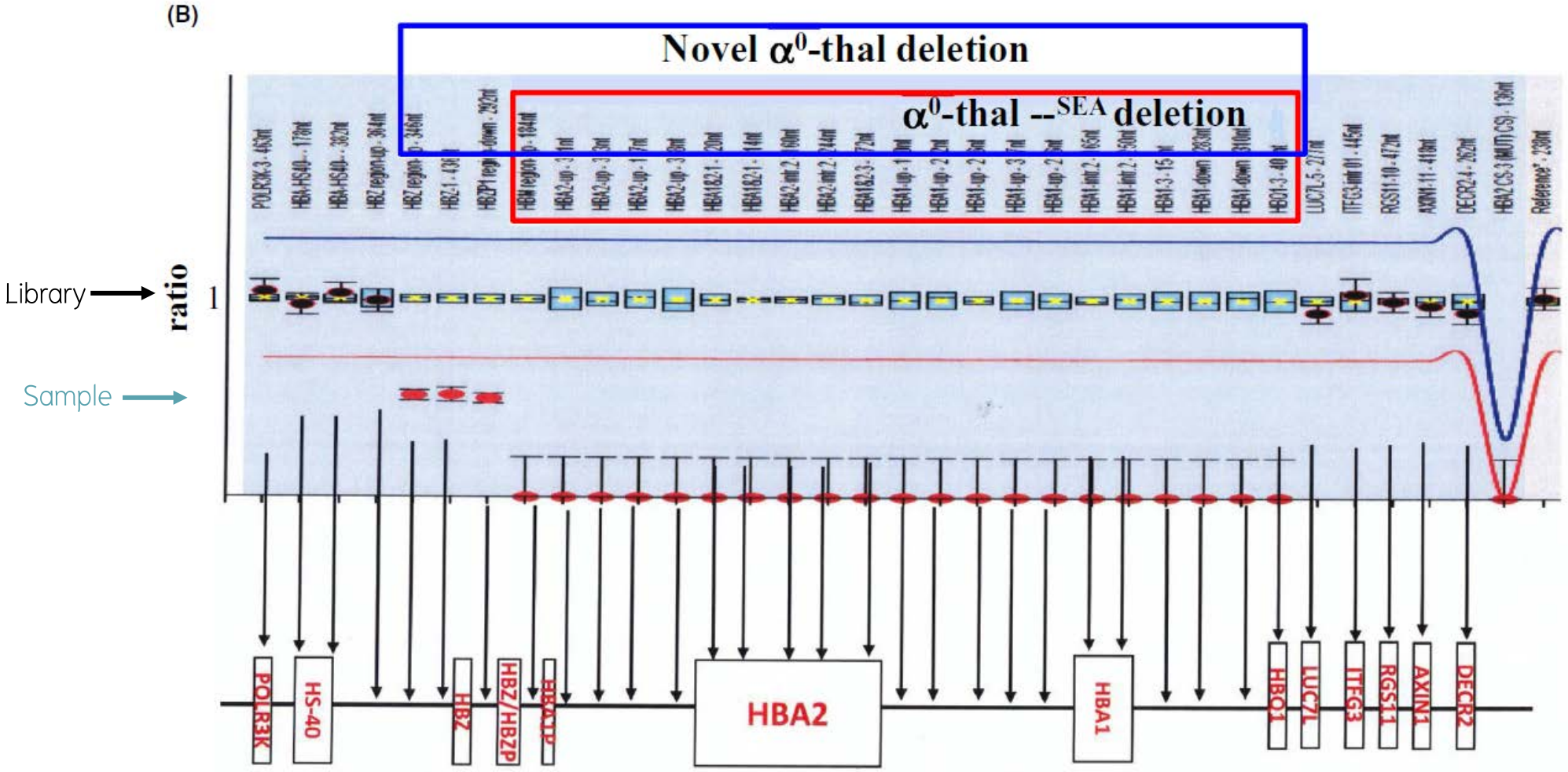
Genotype : $--^{SEA}/--$ (Unknown type)

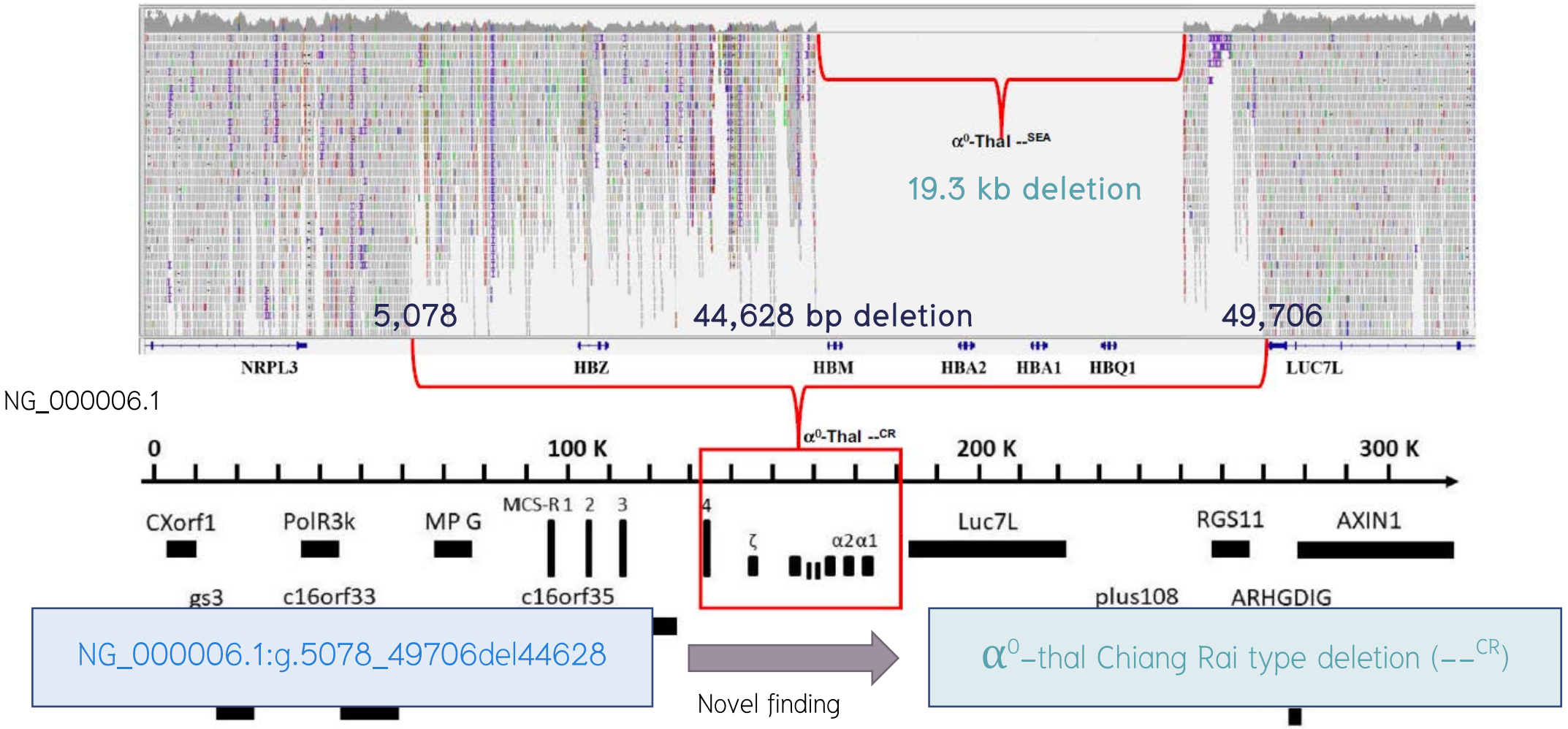
Phenotype : Hb Bart's hydrops fetalis

MLPA analysis of the α-globin gene cluster from the maternal DNA



MLPA analysis of the α–globin gene cluster from the fetal DNA




α0-Thal --SEA
19.3 kb deletion
5,078
44,628 bp deletion
49,706
NRPL3
HBZ
HBM
HBA2
HBA1
HBQ1
LUC7L
NG_000006.1
α0-Thal --CR
0
100 K
200 K
300 K
CXorf1
PolR3k
MP G
MCS-R 1 2 3
4
ζ
α2α1
Luc7L
RGS11
AXIN1
gs3
c16orf33
c16orf35
plus108
ARHGDIG
NG_000006.1:g.5078_49706del44628
Novel finding
α0–thal Chiang Rai type deletion (––CR)

International Journal of Laboratory Hematology

The Official journal of the International Society for Laboratory Hematology

LETTER TO THE EDITOR

Characterization and identification of Hb Bart's hydrops fetalis caused by a compound heterozygous mutation --^{SEA}/--^{CR}, a novel α^0-thalassemia deletion

Chedtapak Ruengdit, Sitthichai Panyasai, Naowarat Kunyanone, Worawich Phornsiricharoenphant, Chumpol Ngamphiw, Sissades Tongsima, Orapan Sripichai, Serge Pissard, Sakorn Pornprasert

First published: 13 January 2020 | https://doi.org/10.1111/ijlh.13154 | Citations: 8

Prevalence study result

Oct 19 – Sep 20

Total 4,952 samples

4,033 samples

PCR for α^0–thalassemia

Positive for

$--^{SEA}$: 769 samples

$--^{Thai}$: 3 samples

Negative for $--^{SEA}$ & $--^{Thai}$

3,261 samples

- MCV < 80 fL
- HbA_2 < 3.5% (Not β–thal trait)
- HbE trait (HbA_2+E < 25%)

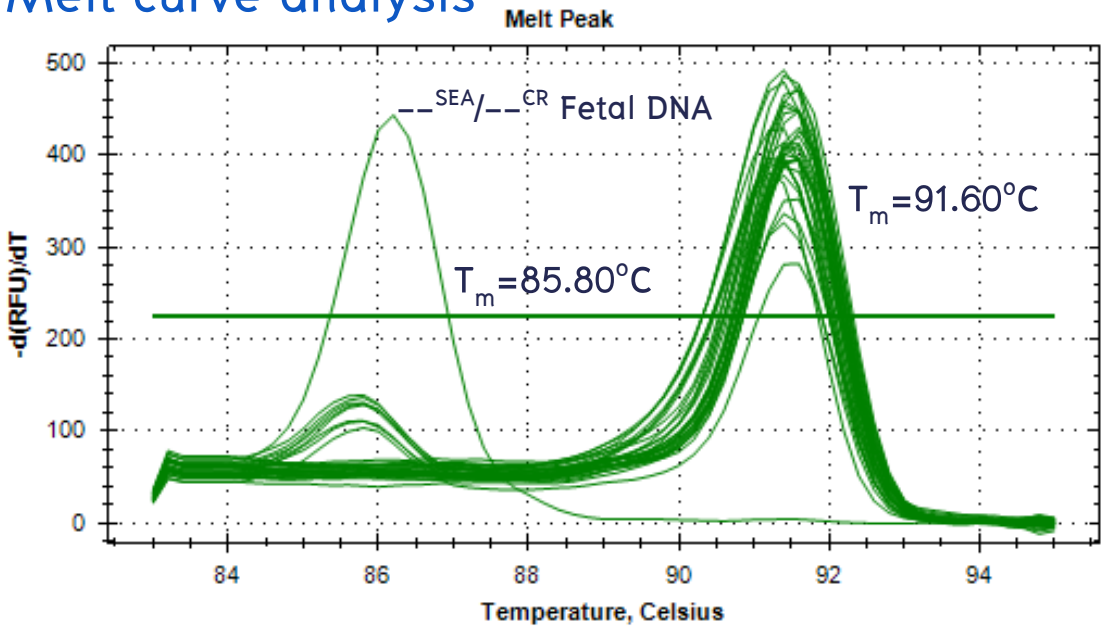
525 samples

Positive for $--^{CR}$: 9 samples (1.71%)

2 samples were deletional Hb H disease

7 samples were heterozygous α^0–thal

Melt curve analysis



SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION
https://doi.org/10.1080/00365513.2022.2040049

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Diagnosis of α^0-thalassemia Chiang Rai ($--^{CR}$) deletion by melt curve analysis in Northern Thailand

Chedtapak Ruengdit[a]*, Pinyaphat Khamphikham[a]*, Manoo Punyamung[b], Panida Pongpunyayuen[b] and Sakorn Pornprasert[a]

[a]Department of Medical Technology, Division of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand; [b]Faculty of Associated Medical Sciences, Clinical Service Center, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

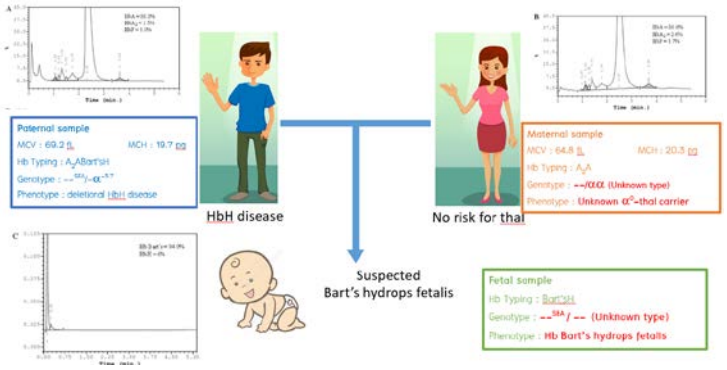
ABSTRACT

A large novel 44.6 kb deletion named α^0-thalassemia Chiang Rai ($--^{CR}$) was first described in the individuals with uncommon Hb Bart's hydrops fetalis and HbH disease. This study aimed to develop a real-time gap PCR and melt curve analysis for the detection of $--^{CR}$ and investigate its frequency in northern Thailand. Among 4,952 blood samples, the assay was performed in 525 samples with a mean corpuscular volume (MCV) < 80 fL, $HbA_2 < 3.5\%$, $HbA_2+E < 25\%$, and negative for common deletional α^0-thalassemia $--^{SEA}$ and $--^{THAI}$. The developed method showed T_m values of 85.8 ± 0.0 °C and 91.5 ± 0.1 °C, which were specific for $--^{CR}$ and wild-type alleles, respectively. Nine (0.18% of 4,952 or 1.71% of 525) were positive for $--^{CR}$, in which two were HbH disease and the rest were heterozygous for $--^{CR}$. This study demonstrated the success of real-time gap PCR with melt curve analysis for $--^{CR}$ diagnosis. Additionally, the prevalence of $--^{CR}$ in the northern Thai population was comparable to $--^{THAI}$. Thus, this study implies the importance of $--^{CR}$ in northern Thailand. Moreover, the developed real-time gap PCR with melt curve analysis is simple and highly accurate, and may be considered as an additional tool for routine α^0-thalassemia $--^{CR}$ diagnosis in this region.

ARTICLE HISTORY
Received 23 September 2021
Revised 20 January 2022
Accepted 6 February 2022

KEYWORDS
α^0-thalassemia; Hb Bart's hydrops fetalis; melt curve analysis; Chiang Rai deletion; northern Thailand

Routine case → Research → Routine



International Journal of Laboratory Hematology
The Official journal of the International Society for Laboratory Hematology
ISLH

LETTER TO THE EDITOR

Characterization and identification of Hb Bart's hydrops fetalis caused by a compound heterozygous mutation --^{SEA}/--^{CR}, a novel α^{0}-thalassemia deletion

Chedtapak Ruengdit, Sitthichai Panyasai, Naowarat Kunyanone, Worawich Phornsiricharoenphant, Chumpol Ngamphiw, Sissades Tongsima, Orapan Sripichai, Serge Pissard, Sakorn Pornprasert

First published: 13 January 2020 | https://doi.org/10.1111/ijlh.13154 | Citations: 8

SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION
https://doi.org/10.1080/00365513.2022.2040049
Taylor & Francis

ORIGINAL ARTICLE

Diagnosis of α^{0}-thalassemia Chiang Rai (--^{CR}) deletion by melt curve analysis in Northern Thailand

Chedtapak Ruengdit[a]*, Pinyaphat Khamphikham[a]*, Manoo Punyamung[b], Panida Pongpunyayuen[b] and Sakorn Pornprasert[a]

[a]Department of Medical Technology, Division of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand; [b]Faculty of Associated Medical Sciences, Clinical Service Center, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

ABSTRACT
A large novel 44.6 kb deletion named α^{0}-thalassemia Chiang Rai (--^{CR}) was first described in the individuals with uncommon Hb Bart's hydrops fetalis and HbH disease. This study aimed to develop a real-time gap PCR and melt curve analysis for the detection of --^{CR} and investigate its frequency in northern Thailand. Among 4,952 blood samples, the assay was performed in 525 samples with a mean corpuscular volume (MCV) < 80fL, HbA_2 < 3.5%, HbA_2+E < 25%, and negative for common deletional α^{0}-thalassemia --^{SEA} and --^{THAI}. The developed method showed T_m values of 85.8 ± 0.0 °C and 91.5 ± 0.1 °C, which were specific for --^{CR} and wild-type alleles, respectively. Nine (0.18% of 4,952 or 1.71% of 525) were positive for --^{CR}, in which two were HbH disease and the rest were heterozygous for --^{CR}. This study demonstrated the success of real-time gap PCR with melt curve analysis for --^{CR} diagnosis. Additionally, the prevalence of --^{CR} in the northern Thai population was comparable to --^{THAI}. Thus, this study implies the importance of --^{CR} in northern Thailand. Moreover, the developed real-time gap PCR with melt curve analysis is simple and highly accurate, and may be considered as an additional tool for routine α^{0}-thalassemia --^{CR} diagnosis in this region.

ARTICLE HISTORY
Received 23 September 2021
Revised 20 January 2022
Accepted 6 February 2022

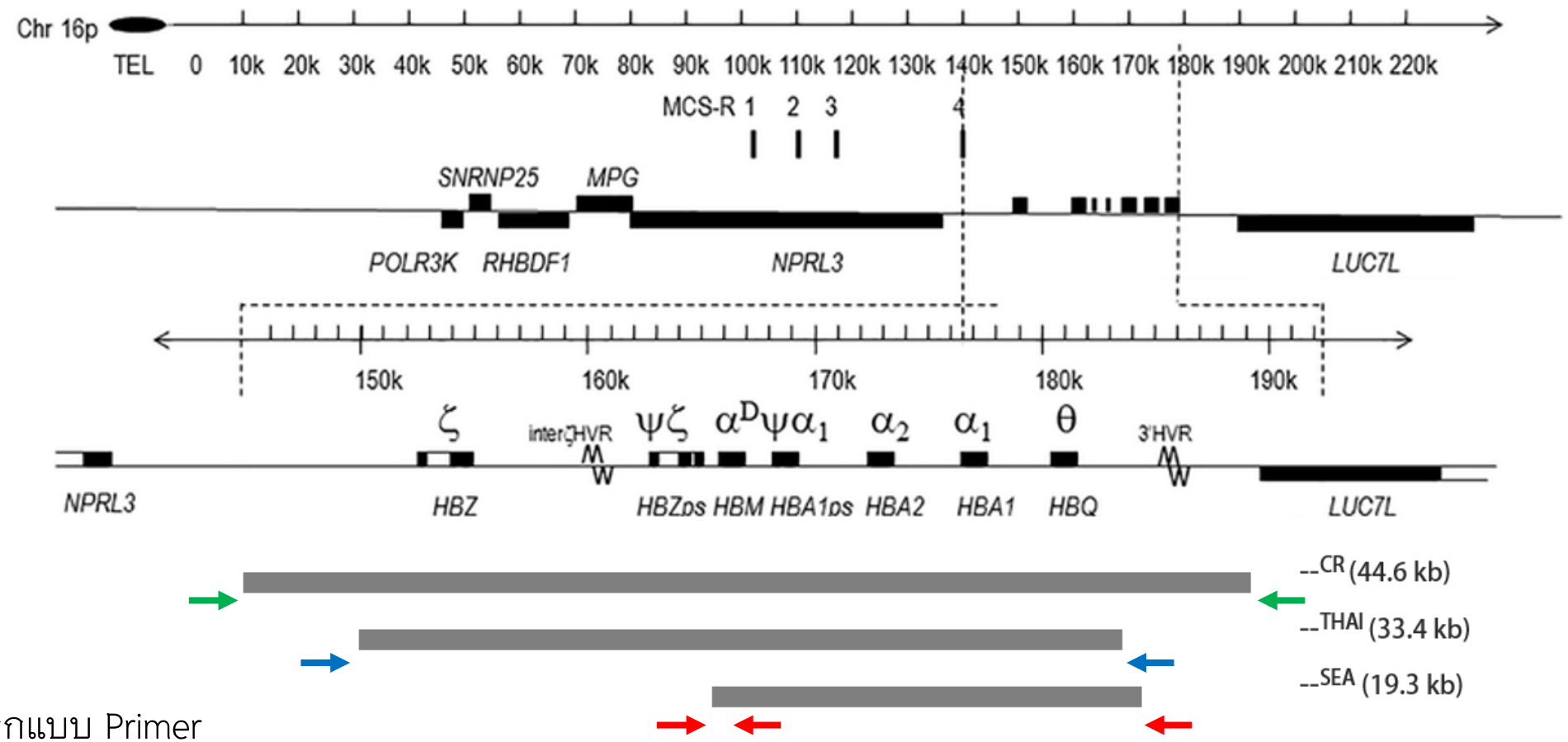
KEYWORDS
α^{0}-thalassemia; Hb Bart's hydrops fetalis; melt curve analysis; Chiang Rai deletion; northern Thailand

นำมาเปิดให้บริการงานประจำวัน

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจ α^0–thalassemia ชนิด $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, และ $--^{CR}$ ด้วยวิธี Realtime–PCR with HRM analysis และพร้อมทั้งนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปค้นหาความชุกของ α^0–thalassemia ชนิด $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, และ $--^{CR}$

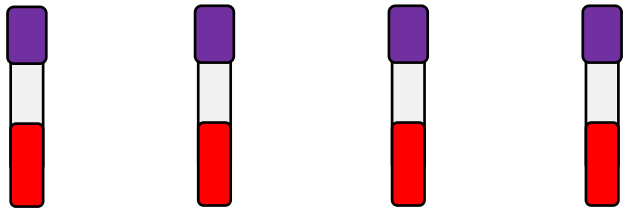
ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ



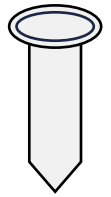
ออกแบบ Primer

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ

1. พัฒนาการตรวจ Realtime PCR with EvaGreen and HRM analysis



สกัด DNA



DNA

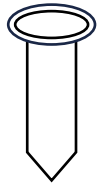
ปรับปรุงวิธีการตรวจ Realtime PCR

ผ่านการขอยกเว้นการพิจารณาด้านจริยธรรม
การวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย

2. ดำเนินการตรวจในงานประจำวัน

ตุลาคม 2565 ถึงมกราคม 2567

สกัด DNA

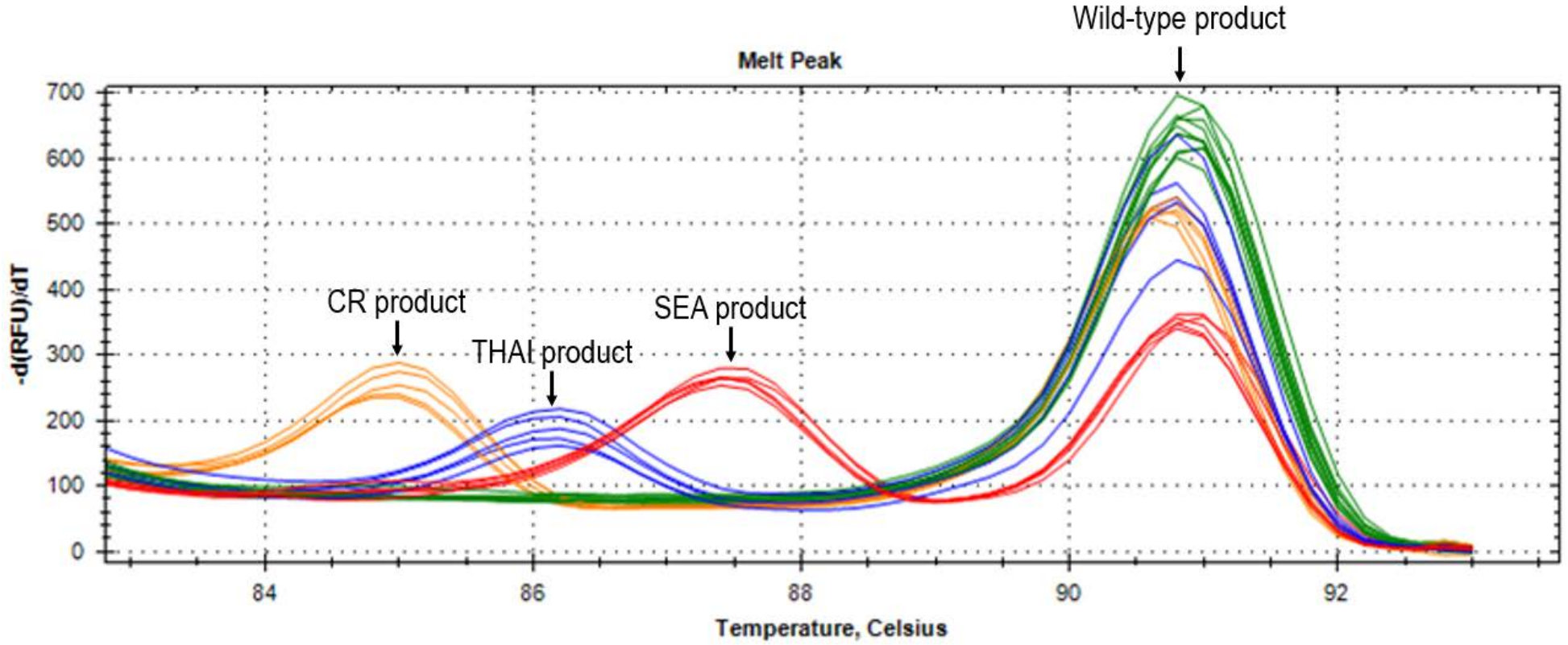


DNA

ใช้งานการตรวจในงานประจำวัน

ผลการดำเนินงาน

ตัวอย่างผล Melting curve analysis for α^0-thal $--^{SEA}$, $--^{THAI}$ and $--^{CR}$



ผลการดำเนินงาน

ความชุกของ α^0-thalassemia $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, และ $--^{CR}$

6,916 ตัวอย่าง

ตุลาคม 2565 ถึง มกราคม 2567

$--^{THAI}$

Phenotypes	จำนวน (%)
$--^{THAI}/\alpha\alpha$	9 (0.13)
$--^{THAI}/-\alpha$	3 (0.04)
total	12 (0.17)

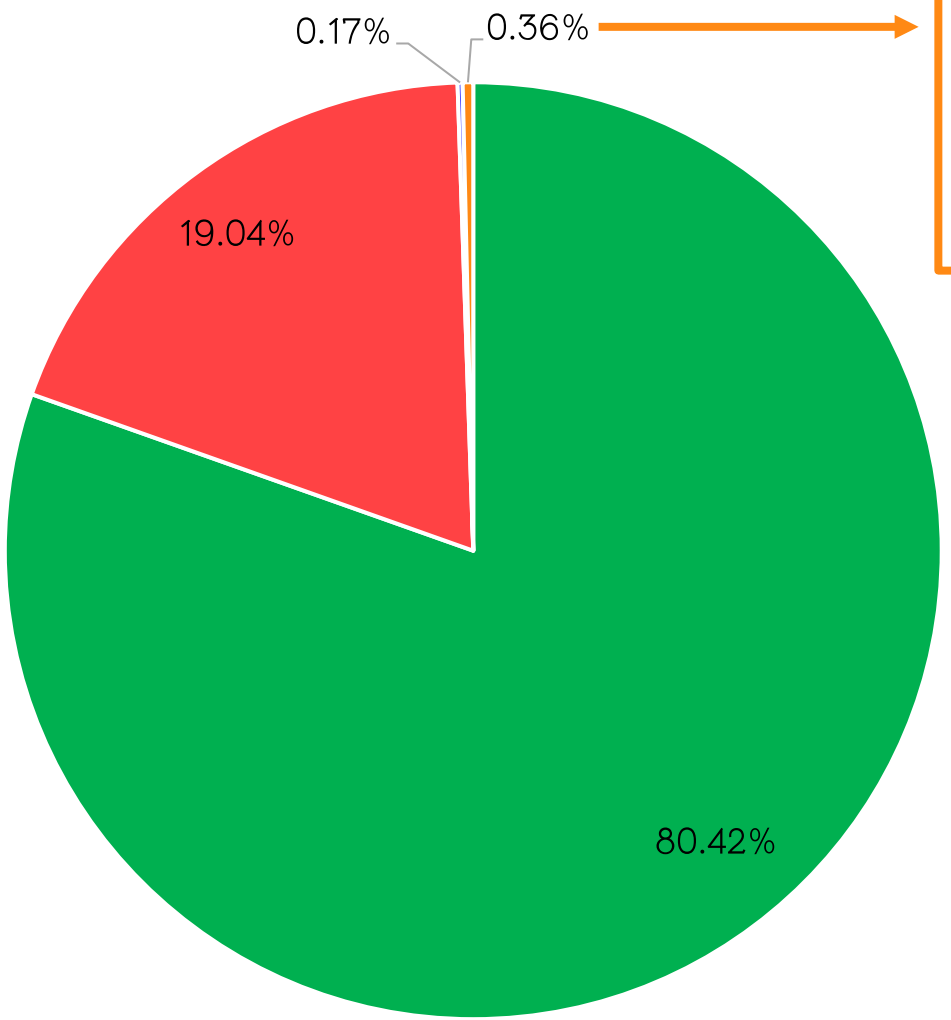
$--^{SEA}$

Phenotypes	จำนวน (%)
$--^{SEA}/\alpha\alpha$	1,013 (14.65)
$--^{SEA}/-\alpha$	254 (3.67)
$--^{SEA}/\alpha\alpha^{ND}$	47 (0.68)
$--^{SEA}/--^{SEA}$	3 (0.04)
total	1,317 (19.04)

$--^{CR}$

Phenotypes	จำนวน (%)
$--^{CR}/\alpha\alpha$	23 (0.33%)
$--^{CR}/-\alpha$	2 (0.03)
total	25 (0.36)

สรุปผลการดำเนินงาน



- พบความชุกของ --^{CR} มากกว่า --^{THAI} ในกลุ่มประชากรภาคเหนือ
- ยังไม่ถูกบรรจุในคู่มือห้องปฏิบัติการ
- ยังไม่มีการรายงานจากห้องปฏิบัติการในภาคอื่นๆ
- พบคู่สามีภรรยา 2 คู่มีความเสี่ยงที่มีบุตรเป็น Hb Bart's hydrops ร่วมกับ --^{SEA}

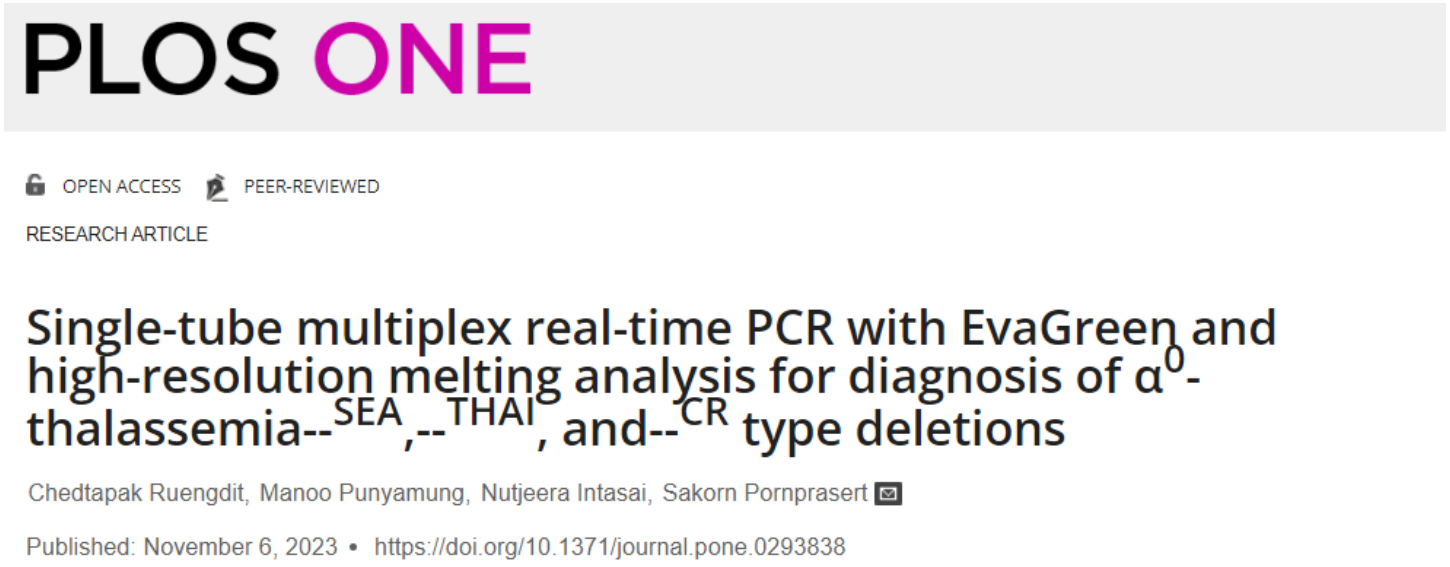
ประโยชน์ที่หน่วยงานได้รับ

- ✓ ใช้งานได้จริง
- ✓ ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจ
- ✓ ลดเวลาการตรวจ
- ✓ เพิ่มการตรวจให้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

การขยายผล

- ✓ นำข้อมูลเสนอต่อคณะกรรมการจัดทำคู่มือปฏิบัติงานการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติแห่งชาติ
- ✓ นำเสนอข้อมูลเสนอในงานสัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติ ครั้งที่ 25

- ✓ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ


PLOS ONE

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

Single-tube multiplex real-time PCR with EvaGreen and high-resolution melting analysis for diagnosis of α^0-thalassemia--^{SEA},--^{THAI}, and--^{CR} type deletions

Chedtapak Ruengdit, Manoo Punyamung, Nutjeera Intasai, Sakorn Pornprasert

Published: November 6, 2023 • https://doi.org/10.1371/journal.pone.0293838

จบการนำเสนอ

ขอบคุณครับ