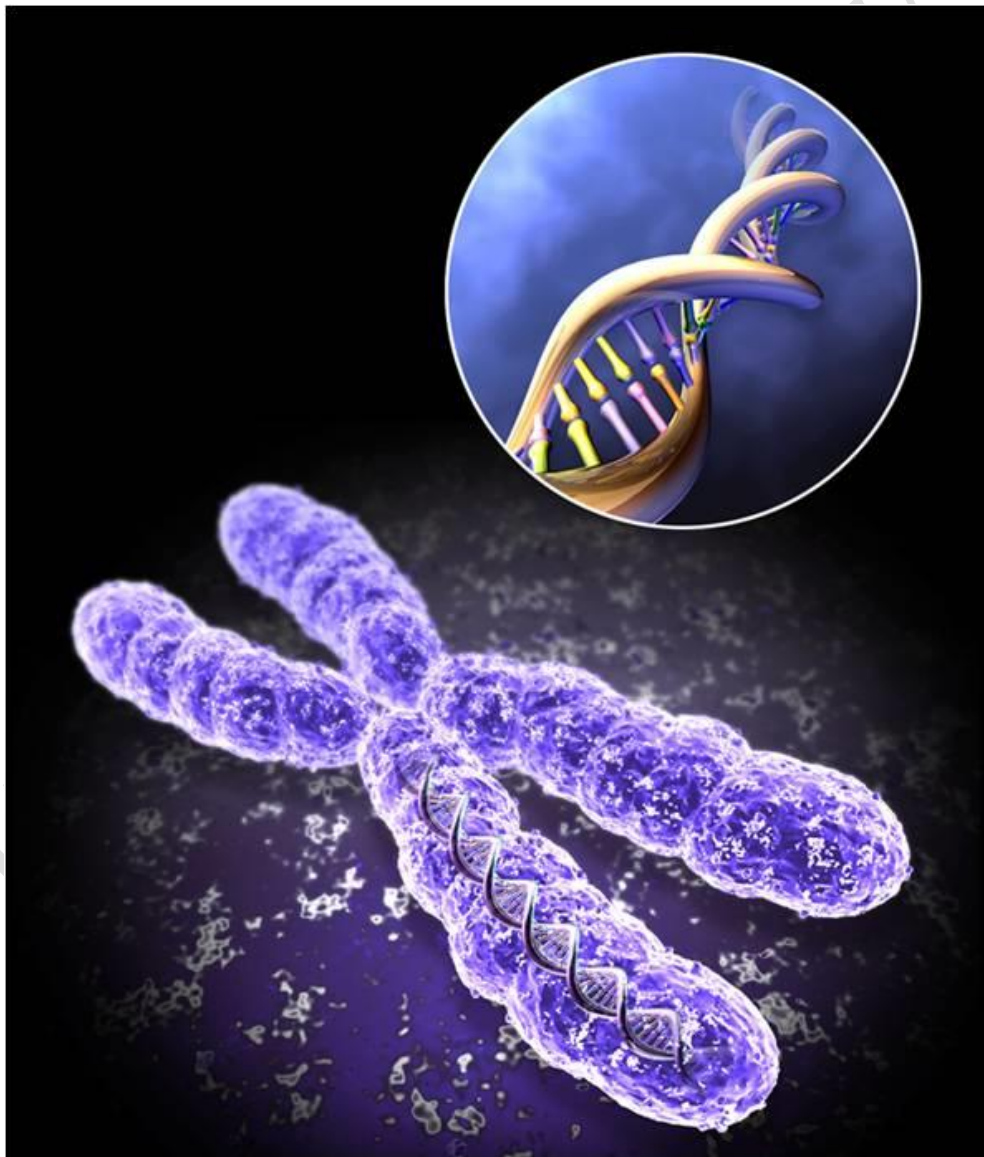


คู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ศูนย์โครโมโซม พ.ศ. 2553

WI-LB-02



คำนำ

ศูนย์โครโมโซม ให้บริการการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรม เพื่อค้นหาความผิดปกติในระดับโครโมโซม จนถึงความผิดปกติระดับดีเอ็นเอ โดยยึดมั่นนโยบายคุณภาพ ให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่รายงานผลอย่างถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ได้มาตรฐาน และมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบการบริหารคุณภาพอย่างต่อเนื่อง โดยมุ่งเน้นความพึงพอใจสูงสุดของลูกค้าและผู้ที่เกี่ยวข้อง

คู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการฉบับนี้ได้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นข้อแนะนำให้ผู้ให้บริการเลือกใช้การตรวจและทราบถึงวิธีการส่งตรวจได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

ศูนย์โครโมโซมหวังเป็นอย่างยิ่งว่า คู่มือฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และสามารถตอบสนองความต้องการของผู้ให้บริการเพื่อให้เกิดความพึงพอใจสูงสุด หากผู้ให้บริการมีข้อสงสัยหรือคำชี้แนะประการใด กรุณาติดต่อศูนย์โครโมโซม ทางศูนย์โครโมโซมยินดีตอบข้อสงสัยและน้อมรับคำชี้แนะเพื่อนำไปปรับปรุงและพัฒนาการบริการให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

คณะผู้จัดทำ

มิถุนายน 2553

ศูนย์โครโมโซม มุ่งมั่นให้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่รายงานผลอย่างถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว ได้มาตรฐานและมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบการบริหารงานคุณภาพอย่างต่อเนื่อง โดยมุ่งเน้นความพึงพอใจสูงสุดของลูกค้าและผู้ที่เกี่ยวข้อง

สารบัญ

	หน้า
รายการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมที่เปิดให้บริการ	4
คำแนะนำในการเลือกการส่งตรวจวิเคราะห์	
1. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากน้ำคร่ำ	5
2. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากเลือด	8
3. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากไขกระดูก (Bone marrow) และ Peripheral blood ของโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว	10
4. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากชิ้นเนื้อ	12
5. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยเทคนิค FISH (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)	13
5.1 การตรวจวิเคราะห์โรค DiGeorge syndrome	
5.2 การตรวจวิเคราะห์โรค Williams syndrome	
5.3 การตรวจวิเคราะห์โรค Prader-willi syndrome	
5.4 การตรวจ fusion gene BCR/ABL โดยเทคนิค FISH	
5.5 การตรวจ fusion gene PML/RARA โดยเทคนิค FISH	
5.6 การตรวจวิเคราะห์โรค Chromosome X, Y enumeration	
5.7 การตรวจวิเคราะห์โรค Chromosome X, Y, 13, 18, 21, enumeration	
5.8 การตรวจวิเคราะห์โรค Alagille(JAG1) syndrome	
5.9 การตรวจวิเคราะห์โรค Rubinstein-Taybi syndrome	

รายการตรวจวิเคราะห์ทางพันธุกรรมที่เปิดให้บริการ

1. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากน้ำคร่ำ
(Chromosome analysis with karyotype in Amniotic fluid)
2. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากเลือด
(Chromosome analysis with karyotype in blood)
3. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากไขกระดูก (Bone marrow) และ Peripheral blood ของโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว
(Chromosome analysis with karyotype in bone marrow/ Peripheral blood of Leukemia)
4. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากชิ้นเนื้อ
(Chromosome analysis with karyotype in tissue)
5. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยเทคนิค FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)
 - 5.1 การตรวจวิเคราะห์โรค DiGeorge syndrome
 - 5.2 การตรวจวิเคราะห์โรค Williams syndrome
 - 5.3 การตรวจวิเคราะห์โรค Prader-willi syndrome
 - 5.4 การตรวจ fusion gene BCR/ABL โดยเทคนิค FISH
 - 5.5 การตรวจ fusion gene PML/RARA โดยเทคนิค FISH
 - 5.6 การตรวจวิเคราะห์โรค Chromosome X, Y enumeration
 - 5.7 การตรวจวิเคราะห์โรค Chromosome X, Y, 13, 18, 21, enumeration
 - 5.8 การตรวจวิเคราะห์โรค Alagille(JAG1) syndrome
 - 5.9 การตรวจวิเคราะห์โรค Rubinstein-Taybi syndrome

คำแนะนำในการเลือกการส่งตรวจวิเคราะห์

1. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากน้ำคร่ำ

ในทางการแพทย์ เราพบว่าสตรีที่มีอายุเกิน 35 ปีขึ้นไป มีความผิดปกติของโครโมโซมของทารกในครรภ์สูงกว่าคนที่อายุน้อยกว่า 35 ปี เนื่องจากในน้ำคร่ำของหญิงที่ตั้งครรภ์ จะมีเซลล์ของเด็กหลุดลอยออกมา เราเอาเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงให้มีการแบ่งตัว แล้วเอาโครโมโซมของเซลล์เหล่านั้น มาศึกษาว่ามีความผิดปกติหรือไม่ เป็นการศึกษโครโมโซมในระยะ metaphase โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำมาเตรียมโครโมโซม แล้ว จึงนำไปวิเคราะห์โครโมโซมแต่ละแท่งทั้งจำนวนและโครงสร้างด้วยเทคนิค G-banding และ/หรือ Q-banding

โดยใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ ทำให้เราสามารถทราบความผิดปกติของโครโมโซมของเด็กได้ก่อนที่เด็กจะเกิด

หญิงมีครรภ์ที่ควรได้รับการตรวจ ควรมีข้อบ่งชี้ ดังนี้

- หญิงที่อายุตั้งแต่ 35 ปี ที่วันกำหนดคลอด
- หญิงที่เคยมีบุตรที่มีความผิดปกติของโครโมโซม
- หญิงที่มีโครโมโซมผิดปกติแบบ balanced translocation หรือมีสามีที่มีโครโมโซมผิดปกติ

ในลักษณะ ดังกล่าว

- หญิงที่เป็นพาหะของโรคพันธุกรรม X-linked Recessive
- หญิงที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยทางด้าน biochemical screening แล้วพบว่ามีความเสี่ยงสูงที่ทารกในครรภ์จะมีความผิดปกติของโครโมโซม
- หญิงที่พบความผิดปกติของทารกในครรภ์ จากการตรวจ Ultra-sound

ข้อจำกัดของการทดสอบ

การตรวจวินิจฉัยโครโมโซมที่มีความผิดปกติขนาดเล็ก เช่น microdeletion, microduplication, cryptic chromosomal rearrangement (อาจมีการแนะนำให้ใช้เทคนิคทางด้าน molecular cytogenetics หรือ molecular genetics ในการตรวจวินิจฉัย)

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ดูดน้ำคร่ำประมาณ 1-2 cc. โดยใช้ disposable syringe ทิ้งไป (เพื่อลด Maternal cell contamination) จากนั้นดูดน้ำคร่ำโดยใช้ disposable syringe ประมาณ 20 cc. โดยอาจจะ

- ส่งทั้ง syringe โดยใช้เทปหรือ parafilm พันระหว่างรอยต่อ (ตามภาพ)



หรือ - แบ่งใส่ใน sterile centrifuge tube 2 หรือ 3 tube tube ละ ประมาณ 10 cc. (sterile tube ติดต่อรับได้จากศูนย์โครโมโซม) (ตามภาพ)



การส่งตรวจทุกครั้งต้องระบุรายละเอียดในแบบฟอร์มการส่งตรวจให้ชัดเจนและมากที่สุด เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จเรียบร้อย ควรส่ง specimen ทันทันที โดยรีบแจ้งมายังศูนย์โครโมโซม เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปรับ (specimen ควรมาถึงศูนย์ภายใน 24 ชั่วโมง ภายหลังจากเจาะน้ำคร่ำ) เก็บที่ อุณหภูมิห้องหรือตู้เย็น 37 °C ห้ามแช่แข็ง

2. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากเลือด

เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte) เป็นแหล่งที่สามารถนำมาตรวจโครโมโซมได้ง่ายที่สุด การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซม โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือด(Lymphocyte culture) โดยตัวอย่างเลือดจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์

ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติต่างๆที่ควรส่งตรวจ ได้แก่

1. ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางรูปร่าง (Abnormal morphogenesis)
2. คู่สมรสเคยมีบุตรที่มีลักษณะผิดปกติหรือมีประวัติทารกเสียชีวิตในครรภ์ ทารกคลอดออกมาแล้วเสียชีวิต หรือแท้งติดต่อกัน (Habitual abortion) โดยหาสาเหตุไม่ได้
3. ผู้ป่วยที่เป็นหญิงแต่ไม่เคยมีประจำเดือน (Amenorrhea)
4. เด็กที่มีปัญหาในการเจริญเติบโต หรือพัฒนาการ เช่น พัฒนาการช้า, ปัญญาอ่อน, มีอวัยวะเพศกำกวม, พิการซ้ำซ้อนหลายชนิดแต่กำเนิด, ผู้ที่มีภาวะปัญญาอ่อนและ พัฒนาการช้า ร่วมกับมี dysmorphic feature เป็นต้น

ข้อจำกัดของการทดสอบ

การตรวจวินิจฉัยโครโมโซมที่มีความผิดปกติขนาดเล็ก เช่น microdeletion, microduplication, cryptic chromosomal rearrangement (อาจมีการแนะนำให้ใช้เทคนิคทางด้าน molecular cytogenetics หรือ molecular genetics ในการตรวจวินิจฉัย)

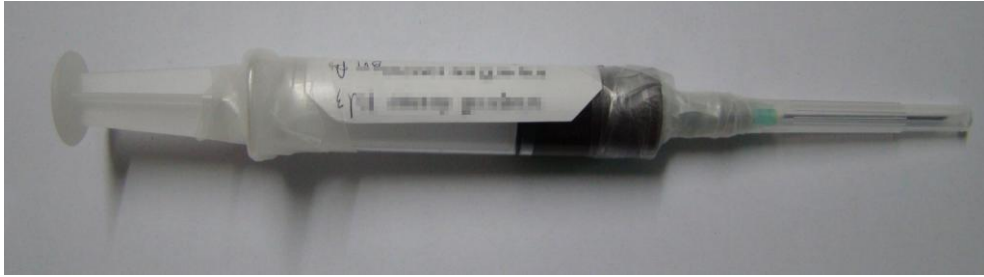
วิธีการเก็บตัวอย่าง

วิธีที่ 1

1. ใช้ sterile disposable syringe 5 cc. ดูด Heparin rinse syringe ให้ทั่วด้วย Heparin แล้ว squeeze ไล่ Heparin ส่วนที่เกินออกให้หมด เหลือแต่จำนวนน้อยพอติด syringe เปลี่ยนเข็มใหม่ เตรียมเจาะเลือดคนไข้

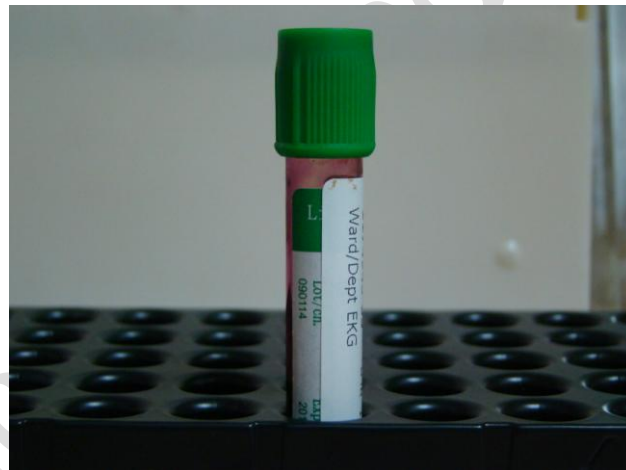
2. ฟอกแขนที่จะเจาะเลือดให้สะอาดด้วยสบู่แล้วเช็ดด้วย Betadine ใช้ sterile precaution เหมือนทำ blood culture ถ้าไม่มี Betadine ให้ใช้ alcohol เช็ดได้ แต่ต้องรอให้แห้งจึงจะเจาะเลือด

3. เจาะเลือดคนไข้ประมาณ 3-5 cc. ใส่ใน syringe แล้วปิดปลอกเข็มให้แน่น เขย่าให้เลือดและ Heparin ให้เข้ากัน ส่งตรวจทั้ง syringe



วิธีที่ 2

เจาะเลือดปริมาณ 3-5 cc. เก็บใส่ในหลอดปราศจากเชื้อที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด sodium heparin หรือ lithium heparin แล้วนำส่ง หากไม่สามารถส่งได้ทันที ให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C ถ้าเป็นเด็กเล็ก ควรให้ได้อย่างน้อย 1-2 cc.



การส่งตรวจทุกครั้งต้องระบุรายละเอียดในแบบฟอร์มการส่งตรวจให้ชัดเจนและมากที่สุด เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จเรียบร้อยแล้ว ควรส่ง specimen ทันที โดยรีบแจ้งมายังศูนย์โครโมโซม เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปรับ (specimen ควรมาถึงศูนย์ภายใน 24 ชั่วโมง ภายหลังจากเจาะ) ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากไขกระดูก (Bone marrow) และ Peripheral blood ของโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว

การตรวจวินิจฉัยโครโมโซมของโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาว

เป็นการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวทุกชนิด ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ในระยะ Metaphase โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์และนำมาเตรียมโครโมโซม แล้วจึงนำไปวิเคราะห์โครโมโซมแต่ละแท่งทั้งจำนวนและโครงสร้างด้วย Q-banding และวิเคราะห์ตามเกณฑ์ของ An international System for Human Chromosome Nomenclature 2005 (ISCN 2005) และ American College of Medical Genetics: Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories: 2006 edition (Clinical Cytogenetics)

การตรวจวินิจฉัยโครโมโซมสามารถช่วยวินิจฉัย Clonal neoplastic process ได้ เพราะสามารถตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมอย่างเฉพาะในโรคมะเร็งบางชนิดได้ เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด CML ประมาณ 99 % จะพบโครโมโซมฟิลาเดเฟียในเซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยและความผิดปกติของโครโมโซมชนิด translocation 15;17 พบเฉพาะในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิด APL-M3 subtype(และสามารถบอกเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่มีโครโมโซมปกติและผิดปกติได้ ฉะนั้นผลการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจะช่วยในการจำแนกชนิดของโรคและพยากรณ์โรคอันจะเป็นประโยชน์ต่อการตัดสินใจของแพทย์ในการให้การรักษา

ข้อจำกัดของการทดสอบ

อาจจะไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมได้หรือวิเคราะห์ผลไม่ได้ตามมาตรฐานที่กำหนด เนื่องจากภาวะของผู้ป่วยเอง (Patient condition) เช่น patient on medication, patient expired at collection เป็นต้น ซึ่งอาจทำให้เกิด no metaphase, low mitotic index

วิธีการเก็บตัวอย่าง

วิธีที่ 1

1. ใช้ sterile disposable syringe 5 cc. ดูด Heparin rinse syringe ให้ทั่วด้วย Heparin แล้ว squeeze ไล่ Heparin ส่วนที่เกินออกให้หมด เหลือแต่จำนวนน้อยพอติด syringe เปลี่ยนเข็มใหม่ เตรียมเจาะเลือดหรือไขกระดูกคนไข้

2. (สำหรับเลือด) ฟอกแขนที่จะเจาะเลือดให้สะอาดด้วยสบู่แล้วเช็ดด้วย Betadine ใช้ sterile precaution เหมือนทำ blood culture ถ้าไม่มี Betadine ให้ใช้ alcohol เช็ดได้ แต่ต้องรอให้แห้ง จึงจะเจาะเลือด

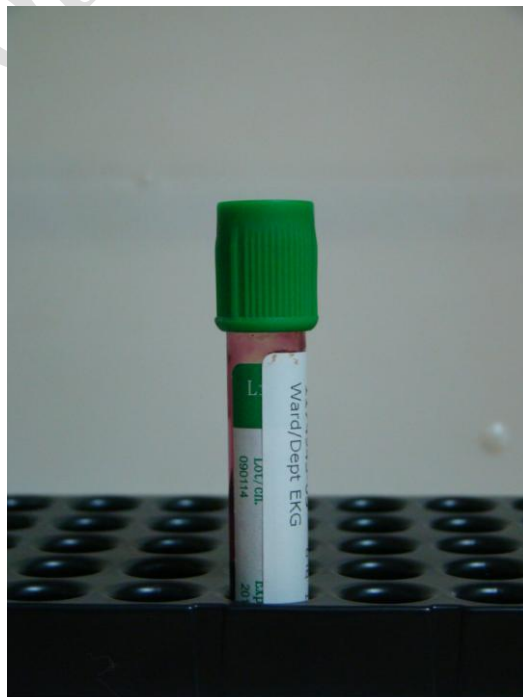
3. เจาะเลือด / ดูดไขกระดูกประมาณ 3-5 cc. ใส่ใน syringe แล้วปิดปลอกเข็มให้แน่น เขย่าให้เลือด/ไขกระดูกและ Heparin ให้เข้ากัน ปิดปลอกเข็มให้แน่น ส่งตรวจทั้ง syringe



วิธีที่ 2

เจาะเลือดปริมาณ 3-5 cc. เก็บใส่ในหลอดปราศจากเชื้อที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด sodium heparin หรือ lithium heparin

การส่งตรวจทุกครั้งต้องระบุรายละเอียดในแบบฟอร์มการส่งตรวจให้ชัดเจนและมากที่สุด เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จเรียบร้อย ควรส่ง specimen ทันที โดยรีบแจ้งมายังศูนย์โครโมโซม เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปรับ (specimen ควรมาถึงศูนย์ภายใน 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการเจาะ) ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส



4. การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมจากชิ้นเนื้อ

ข้อบ่งชี้ในการส่งตรวจโครโมโซม จาก Tissue

- เพื่อศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมทารกที่เสียชีวิตในครรภ์
- เพื่อวินิจฉัยสาเหตุการแท้ง

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ควรเลือกชิ้นเนื้อของตัวอ่อนจริงๆ เช่น ตัวอ่อน ชี้นรก เลือกชิ้นที่มีเลือดไปเลี้ยง ไม่เก็บส่วนที่เน่าเสีย หากเป็นผิวหนังให้ตัดลึกถึงชั้น dermis ขนาดชิ้นเนื้อที่เก็บควรมีขนาดอย่างน้อย 1x1 cm. เก็บโดยวิธีปราศจากเชื้อเท่านั้น

เก็บชิ้นเนื้อใส่ในกระป๋องพลาสติกหรือขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ ที่บรรจุ Normal saline sterile การส่งตรวจทุกครั้งต้องระบุรายละเอียดในแบบฟอร์มการส่งตรวจให้ชัดเจนและมากที่สุด เมื่อเก็บตัวอย่างเสร็จเรียบร้อยแล้ว ควรส่ง specimen ทันที โดยรีบแจ้งมายังศูนย์โครโมโซม เพื่อส่งเจ้าหน้าที่ไปรับ ถ้าไม่สามารถส่งได้ทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

5. การวินิจฉัยโครโมโซมโดยเทคนิค FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

เทคนิค FISH เป็นวิธีการศึกษาโครโมโซมหรือยีนทางอณูเซลล์พันธุศาสตร์ ที่ใช้ probe ซึ่งติดสลาควัยสารเรืองแสง ไปจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง สามารถศึกษาได้ในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะ metaphase และ interphase โดยให้ผลการวินิจฉัยในระยะเวลาอันสั้น และสามารถบอกเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ปกติและผิดปกติได้ การวินิจฉัยโครโมโซมโดยเทคนิค FISH สามารถทำได้กับตัวอย่างจากเลือด น้ำคร่ำ และไขกระดูก โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเหมือนกัน แต่ใช้ตัวตรวจจับ (probe) ในการย้อมสไลด์แทนการย้อมสีเท่านั้น

- การตรวจโครโมโซมเพศ โดยเทคนิค FISH มีประโยชน์ในการติดตามผลการปลูกถ่ายไขกระดูก กรณีที่ donor และ recipient ต่างเพศกัน
- การตรวจ Fusion gene BCR/ABL, PML/RARA โดยเทคนิค FISH สามารถบอกเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ปกติ และจำนวนเซลล์มะเร็งที่มียีน rearrangement ซึ่งช่วยแก้ปัญหาในบางครั้งที่การวิเคราะห์โครโมโซมโดยวิธีการทำ karyotype ไม่ได้ผลเนื่องจากโครโมโซมระยะ metaphase มีจำนวนไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย หรือคุณภาพของโครโมโซมไม่ดีพอที่จะทำ karyotype หรือ วิเคราะห์ได้
- การตรวจหาบริเวณที่ขาดหายไปบนโครโมโซมที่เป็นสาเหตุของกลุ่มอาการ DiGeorge syndrome (22q11.2), Prader-Willi syndrome (15q13.3), Williams syndrome (7q11.23), Alagille (JAG1) syndrome และ Rubinstein-Taybi syndrome
- การตรวจ Down's syndrome ซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนของแท่งโครโมโซม 13,18,21 (trisomy 13,18,21) ในระยะ interphase โดยเทคนิค FISH ซึ่งช่วยในการตัดสินใจของแพทย์ที่ต้องทำการรักษาอย่างเร่งด่วน

ข้อบ่งชี้ของการวินิจฉัยทางด้าน Molecular Cytogenetics

- ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นกลุ่มอาการ Microdeletion syndrome
- ผู้ป่วยที่ไม่สามารถอ่านผลการวิเคราะห์โครโมโซมได้อย่างชัดเจน หรือเพื่อหา/ยืนยัน unknown segment of chromosome หรือ marker chromosome
- ผู้ป่วยที่ไม่สามารถเตรียมโครโมโซมในระยะ metaphase ได้
- ผู้ป่วยที่ต้องการทราบผลด่วนใน 3-5 วัน
- ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาปลูกถ่ายไขกระดูกและแพทย์ต้องการทราบอัตราส่วนของเซลล์ donor/recipient

ข้อจำกัดของการทดสอบ

- ไม่สามารถตรวจหาความผิดปกติในหลายๆ รูปแบบจากการทดสอบเพียง 1 ครั้ง
- สำหรับการทดสอบ Prader-Willi syndrome เทคนิค FISH ไม่สามารถตรวจความผิดปกติที่เกิดมาจากสาเหตุ Uniparental disomy ได้ ดังนั้นจึงควรตรวจด้วยเทคนิคอื่นเช่น methylation หรือ CA repeat

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ใช้วิธีเก็บตัวอย่าง เช่นเดียวกันกับ การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจโครโมโซมสำหรับแต่ ละ specimen