บทความวิจัย (Research Article)

การพัฒนาวิธีการตรวจก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำของกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี droplet digital PCR

เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์[1*], ธนพัฒน์ แพ่งเกสร[2], อรุณี ปิงยศ[3], ขวัญฤดี มหิงสา[3], วรรณวิภา บำรุงภักดี[3] และ ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี[3]

Development of noninvasive prenatal testing of down's syndrome by droplet digital PCR

Narutchala Suwannakhon[1*], Tanapat Pangeson[2], Arunee Pingyod[3], Khwanruedee Mahingsa[3], Wanwipa Bumrungpakdee[3], and Torpong Sanguansermsri[3]

[1] School of Science, University of Phayao, Phayao, 56000

[2] School of Medical Science, University of Phayao, Phayao, 56000

[3] Thalassaemia Unit, University of Phayao, Phayao 56000

* Correspondence author: narutchala@gmail.com

Health Science, Science and Technology Reviews. 2023;16(2): 40-52.

Received: 23 April 2022; Revised: 16 August 2022; Accepted: 29 August 2023

บทคัดย่อ

กลุ่มอาการดาวน์ (Down's syndrome) เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมแบบ aneuploidy ของโครโมโซม 21 (trisomy 21: T21) ที่พบได้บ่อย ปัจจุบันได้มีการตรวจคัดกรองก่อนคลอดในหญิงตั้งครรภ์ที่อายุมาก ด้วยเทคโนโลยีทางดีเอ็นเอขั้นสูงซึ่งมีค่าใช้จ่ายและความซับซ้อนมาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองแบบไม่รุกล้ำ (NIPT) ของกลุ่มอาการ T21 ด้วยวิธี droplet digital PCR (ddPCR) การพัฒนาวิธี ddPCR ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้สกัดจากเลือดของเด็ก T21 เลือดและพลาสมาของผู้หญิงปกติที่ไม่ตั้งครรภ์ จากนั้นนำวิธีการที่ได้มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมา (cfDNA) ของหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 30 ตัวอย่าง ค่าอัตราส่วนระหว่าง mutant allele/wild type allele คำนวณโดยโปรแกรม Bio-Rad QuantaSoft Analysis อัตราส่วนของเลือดและพลาสมาผู้หญิงปกติที่ไม่ตั้งครรภ์ คือ 1.043±0.073 และ 0.710±0.019 ตามลำดับ อัตราส่วนของผู้ป่วย T21 คือ 1.486±0.107 อัตราส่วนของพลาสมาจากตัวอย่างควบคุมเชิงลบ คือ 0.705±0.074 และผลของ cfDNA จากพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ 29 ตัวอย่าง คือ 0.742±0.062 โดยอัตราส่วนที่ได้ของหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมดพบว่ามีโอกาสต่ำที่ทารกในครรภ์จะเป็น T21 โดยผลของ NIPT ของ 29 ตัวอย่างให้ผลตรงกับการตรวจด้วยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ มีหนึ่งตัวอย่างที่ถูกคัดออกเนื่องจากเป็น vanishing twin ดังนั้นการตรวจคัดกรองแบบไม่รุกล้ำด้วยวิธี ddPCR สามารถตรวจสอบ cfDNA ที่เสี่ยงต่ำต่อ T21 ได้ แต่จำเป็นต้องมีตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามากกว่านี้เพื่อให้ได้ตัวอย่าง cfDNA ของหญิงตั้งครรภ์ที่มีฟีตัสเสี่ยงเป็น T21

คำสำคัญ: ดาวน์ซินโดรม, การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด, การตรวจก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำ, ดีดีพีซีอาร์

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[2] คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[3] หน่วยธาลัสซีเมีย มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Abstract

Down's syndrome caused by aneuploidy of chromosome 21 (trisomy 21: T21) has high prevalence. Nowadays, advanced DNA technologies are used in noninvasive prenatal testing (NIPT) to screen for numerical chromosomal abnormalities in pregnancy at advanced maternal age. These technologies are expensive and complicated. The aim of this study is to develop the droplet digital PCR (ddPCR) technique for NIPT of T21. DdPCR condition was optimized by using DNA samples extracted from blood of children with T21, blood and plasma of non-pregnant normal women. Then, plasma cell-free DNA (cfDNA) from 30 pregnant women was tested using optimized ddPCR. Ratio of mutant allele/wild type allele was calculated by Bio-Rad QuantaSoft Analysis program. The ratios of blood and plasma of non-pregnant women were 1.043±0.073 and 0.710±0.019, respectively. The ratio of T21 patients was 1.486±0.107. The ratio of negative control plasma samples was 0.705±0.074. The result of cfDNA from plasma of 29 pregnant women was 0.742±0.062 which meant that there was a low probability to have T21 fetuses. The results of NIPT in 29 cfDNA samples were the same as those of cytogenetic methods. One cfDNA sample was excluded because of vanishing twin syndrome. Thus, this developed ddPCR-based NIPT was able to detect a low-risk group for T21; however, more pregnancy plasma samples are needed in order to find pregnant women with high risk of having T21 fetuses.

Keywords: Down's syndrome, Prenatal diagnosis, NIPT, ddPCR

บทนำ

กลุ่มอาการดาวน์ (Down's syndrome) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการมีจำนวนโครโมโซมคู่ที่ 21 เกิน (trisomy 21: T21) หรือชิ้นส่วนบางบริเวณของโครโมโซมคู่ดังกล่าวเกินมา โดยอาการที่พบในผู้ป่วยทุกราย คือ มีความผิดปกติของใบหน้าที่มีลักษณะเฉพาะ บกพร่องทางสติปัญญา และมีพัฒนาการช้า อาจพบความผิดปกติอื่นร่วมด้วย เช่น โรคหัวใจพิการแต่กำเนิด ความผิดปกติของตา การได้ยินบกพร่อง เป็นต้น [1,2]

รายงานจากเครือข่ายป้องกันความพิการแต่กำเนิดแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา ได้รายงานอุบัติการณ์การเกิดของทารกกลุ่มอาการดาวน์ประมาณ 1:700 [3] ขณะที่อุบัติการณ์ในประเทศไทยซึ่งได้ศึกษาในภาคใต้ของไทยมีอุบัติการณ์ 1.21:1000 [4] นอกจากนี้การศึกษาในโรงพยาบาลศิริราชมีอุบัติการณ์ 2.89:1000 [5] จากรายงานในสหรัฐอเมริกา ที่ประมาณการค่าใช่จ่ายในการดูแลผู้ป่วยในโรคนี้ตลอดชีวิต พบว่ามีค่าใช้จ่ายประมาณ 20 ล้านบาทต่อคน เมื่อพิจารณาทั้งค่าใช้จ่ายและอุบัติการณ์ของโรคที่สูง อาจกล่าวได้ว่ากลุ่มอาการดาวน์นี้ ส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจในระดับชาติ และอาจส่งผลกระทบในระดับของครอบครัวอีกด้วย [6,7] ในการศึกษาต้นทุนสำหรับการตรวจคัดกรองและตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดในประเทศไทยสำหรับกลุ่มอาการดาวน์พบว่ามีความคุ้มทุน [8] ดังนั้นปัจจุบันมีแนวทางในการป้องกันการให้กำเนิดทารกที่อยู่ในกลุ่มอาการดาวน์ คือ การคัดกรองและการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โดยการตรวจคัดกรองกลุ่มอาการดาวน์นั้นมีหลายวิธีการ เช่น การคัดกรองจากอายุหญิงตั้งครรภ์ที่มีอายุ 35 ปีขึ้นไป การตรวจสารชีวเคมีในน้ำเลือดของหญิงตั้งครรภ์ รวมถึงอัลตราซาวด์ อย่างไรก็ตาม ความจำเพาะของวิธี คัดกรองข้างต้นยังอยู่ในระดับที่ต่ำ [9,10] ทั้งนี้เฉพาะครรภ์ที่ให้ผลเป็นบวกต่อการคัดกรอง จะได้เข้าสู่กระบวนการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด โดยสูติแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างของทารก เช่น การเจาะน้ำคร่ำ หรือการเก็บชิ้นรก [11,12] ด้วยหัตถการที่กล่าวมานี้ เป็นหัตถการรุกล้ำ จึงมีโอกาสที่ทารกจะเกิดการแท้งจากหัตถการได้ [13] ตัวอย่างของทารกที่ได้จากหัตถการ จะได้รับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) [14] ซึ่งใช้เวลานาน 1-2 สัปดาห์ และมีโอกาสที่จะทำ karyotype ไม่ได้สูงจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของทารกไม่ได้ หรืออาจใช้เทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง แต่มีราคาแพง [15]

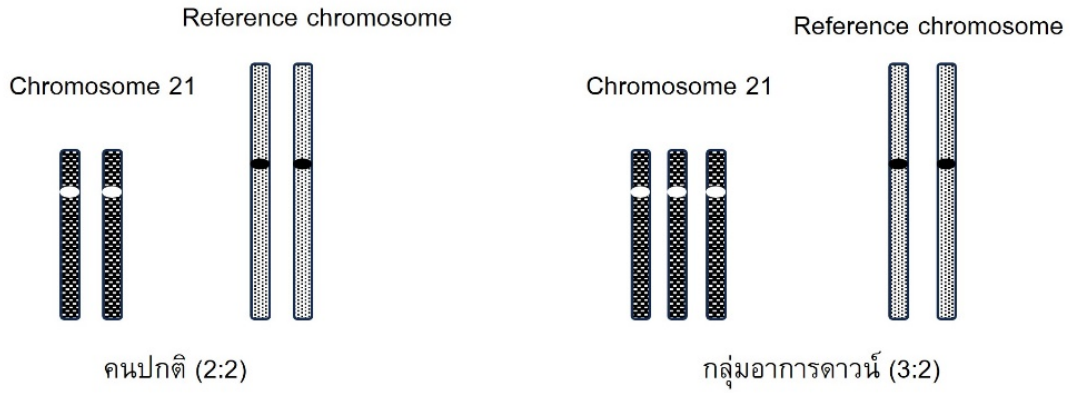
จากที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมด จึงเห็นได้ว่า กระบวนการที่ใช้ในการตรวจคัดกรองในปัจจุบันที่มีความจำเพาะต่ำนี้ ทำให้ทารกที่เป็นปกติ ต้องได้รับความเสี่ยงจากหัตถการไปด้วย อีกทั้งคู่สามีภรรยาที่ตั้งครรภ์ มีโอกาสได้รับผลกระทบจากความวิตกกังวล ในช่วงเวลาที่รอรายงานผลการตรวจวินิจฉัย ตลอดจนค่าตรวจวินิจฉัยที่มีราคาสูง อาจเป็นข้อจำกัดในการเข้าถึงบริการได้

ในรายงานฉบับนี้ จะรายงานถึงการใช้ดีเอ็นเออิสระของทารกในครรภ์ (cell-free fetal DNA – cffDNA) เป็นเป้าหมายในการตรวจคัดกรองก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำ ร่วมกับการใช้เทคโนโลยี droplet digital PCR (ddPCR, 3rd generation PCR) มาทำการตรวจวัดความผิดปกติของสัดส่วน cffDNA ที่ปะปนอยู่ร่วมกับดีเอ็นเออิสระของมารดา (cell-free maternal DNA – cfmDNA) โดยมีสมมติฐาน คือ cffDNA ของทารกกลุ่มอาการดาวน์ที่กระจายตัวในน้ำเลือดของมารดา ซึ่งมีสัดส่วนของโครโมโซมที่ 21 ต่อโครโมโซมอ้างอิง ไม่อยู่ในสัดส่วน 1:1 จะทำให้สัดส่วนโดยรวมของดีเอ็นเออิสระทั้งหมดที่มี cffDNA และ cfmDNA ปะปนกันอยู่ในน้ำเลือดของมารดา ไม่อยู่ในสัดส่วน 1:1 เช่นกัน

ฉะนั้น รายงานฉบับนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการพิสูจน์ถึงความใช้ได้ในการใช้ความผิดปกติของสัดส่วนโครโมโซมที่ 21 ต่อโครโมโซมอ้างอิง ของดีเอ็นเออิสระทั้งหมดในน้ำเลือดของมารดา เพื่อสะท้อนถึงความผิดปกติของสัดส่วนโครโซมดังกล่าวของทารกในครรภ์ โดยมุ่งหวังว่า จะเป็นการเพิ่มความจำเพาะในการตรวจคัดกรอง ลดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการตรวจ

วัสดุและวิธีการทดลอง

ในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์สามารถตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นของฟีตัสได้ ดังนั้นในหญิงตั้งครรภ์ฟีตัสปกติฟีตัสมีจำนวนโครโมโซมแต่ละคู่เป็น 2 แท่ง เช่นเดียวกับมารดา ฉะนั้นอัตราส่วนที่ได้จากการทำ ddPCR มีอัตราส่วนของโครโมโซม 21 (mutant allele) ต่อ โครโมโซมอ้างอิง (โครโมโซม 17; wild type allele) เป็น 2:2 (ratio=1) สำหรับในหญิงตั้งครรภ์ที่มีฟีตัสในครรภ์เป็นกลุ่มอาการดาวน์ ทำให้มีอัตราส่วนเปลี่ยนไปจาก 2:2 เป็น 3:2 ดังภาพ 1 โดยงานวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยพะยา เลขที่ 3/001/63



ภาพ 1 อัตราส่วนของ mutant allele (chromosome 21) ต่อ wild type allele (chromosome 17; reference chromosome)

ตัวอย่างดีเอ็นเอ

เลือดผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์จำนวน 1 ราย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ แต่เนื่องจากปริมาณเลือดที่เก็บได้จากตัวอย่างผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์เมื่อนำมาปั่นเพื่อแยกพลาสมาแล้วได้ปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการสกัดพลาสมาดีเอ็นเอจึงไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาของผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์ สำหรับเลือดผู้หญิงปกติไม่ตั้งครรภ์จำนวน 3 ราย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและพลาสมา โดยดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์ ดีเอ็นเอจากเลือดและพลาสมาของผู้หญิงปกติไม่ตั้งครรภ์ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการสำหรับตรวจสอบกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR เลือดของอาสาสมัครหญิงตั้งครรภ์จำนวน 30 ราย ใช้สำหรับการตรวจสอบก่อนคลอดแบบรุกล้ำ (NIPT) และเลือดของสามีเป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ โดยเก็บเลือดปริมาตร 10 มิลลิลตร สำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมา

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่มี EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเลือด E.Z.N.A. Blood DNA Mini kit Quick Guide (OMEGA BIO-TEK, Georgia, United States) และสำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาเตรียมโดยการนำตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นรอบแรกที่ 2400 รอบ/นาที นาน10 นาที นำพลาสมาที่แยกได้จากการปั่นรอบแรกมาปั่นที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 25 นาที เก็บพลาสมาไว้ที่ -20 °C การปั่นแยกพลาสมาทำภายในสองชั่วโมงหลังจากได้รับเลือดตัวอย่าง (venipunctures) ทำโดยใช้ชุดสกัดตามวิธีการและขั้นตอนของ QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) ร่วมกับอุบปกรณ์ QIAvac 24 Plus (QIAGEN, Hilden, Germany) cfDNA ที่ได้ถูกเก็บไว้ที่ -20 °C

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับการทำ ddPCR

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะกับโครโมโซม 21 และโครโมโซม 17 สำหรับการตรวจกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR โดยไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจสอบ mutant allele และ wild type allele สร้างจาก Program Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ทั้ง Primers และ Probes สั่งผ่านบริษัท Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ไพรเมอร์และโพรบในการใช้ตรวจสอบกลุ่มอาการดาวน์

Type	Name	Sequence	size	Dye
Primer	Trisomy 21-F	TGT TGC CCA CTG GCT GAA GA		-
	Trisomy 21-R	AAG GCC ACC TTA CCT CCC ATC	120 bp	-
Probe	Trisomy 21-probe	TGC GGA GGA GGA TGA CTC GGA TG		FAM
Primer	Ch_CD17-F	GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT G		-
	Ch_CD17-R	CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGA T	108 bp	-
Probe	Ch_CD17-WT	CAC GTT CAC CTT GCC CCA		VIC

ขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์และโพรบแต่ละชุด สำหรับการทำ NIPT ด้วยวิธี ddPCR

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์และโพรบแต่ละชุด ให้มีประสิทธิภาพในการทำ ddPCR ที่ใกล้เคียงกัน โดยไพรเมอร์และโพรบสำหรับการทำ ddPCR ของทั้งโครโมโซม 21 และโครโมโซมอ้างอิง (chromosome 17) ให้มีอัตราส่วนเป็น 2:2 ในคนปกติ และเป็น 3:2 ในผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์และผู้หญิงปกติ ตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาผู้ของหญิงปกติ ถูกนำไปทดสอบตามวิธีของ Bio-Rad QX100 validated ddPCR mutation assays โดยมีส่วนประกอบและสภาวะในการทำ ddPCR ดังตาราง 2 และ 3

ตาราง 2 ส่วนประกอบของ ddPCR สำหรับตรวจสอบกลุ่มอาการดาวน์

Reagent	Final conc.	1X
2X ddPCR super mix	1X	10 µl
Mix TaqMan_primer CD17-WT [18 µM] + probe CD17-WT [5 µM]	0.9 µM, 0.25 µM	1 µl
Mix TaqMan_primer CH21 [18 µM] + probe CH21 [5 µM]	0.9 µM, 0.25 µM	1 µl
DW	-	-
DNA	-	8 µl
Total	-	20 µl

ตาราง 3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR

Temperature (°C)	Time	Ramp rate
95	10 min	Ramp 3 °C/s
94	30 sec	Ramp 3 °C/s
60	1 min	Ramp 3 °C/s
	GOTO step 2, 39X	
98	10 min	Ramp 3 °C/s
4	∞	

การตรวจสอบก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำ (NIPT) ของกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR

นำวิธีการที่พัฒนาขึ้นสำหรับการทำ NIPT โดยไพรเมอร์และโพรบสำหรับการทำ ddPCR ของทั้งโครโมโซม 21 และโครโมโซม 17 มาตรวจสอบกับตัวอย่าง cfDNA จากพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ทั้ง 30 ตัวอย่าง โดยทำควบคู่กับพลาสมาของสามีที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ

การวิเคราะห์ผล

ทำการหาอัตราส่วนระหว่าง mutant allele/wild type allele จากการทำ ddPCR ของทั้งโครโมโซม 21 และโครโมโซม 17 โดยโปรแกรม Bio-Rad QuantaSoft Analysis โดยเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทำ NIPT ด้วยวิธี ddPCR กับวิธีมาตรฐานทางเซลล์พันธุศาสตร์

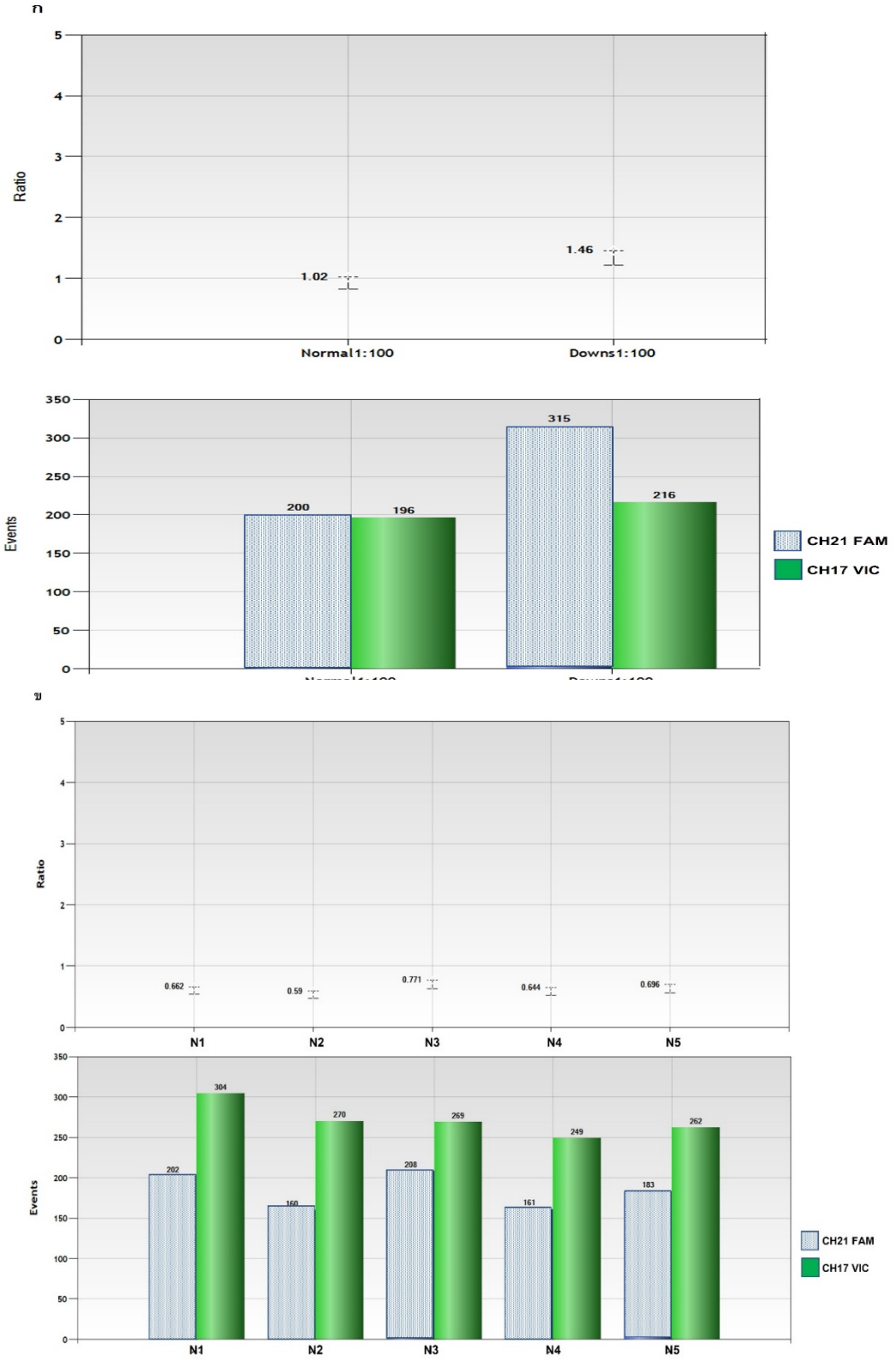
ผลการศึกษา

การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบในการทำ ddPCR

ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบได้มีความยาวของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์จาก ddPCR ใน wild type allele (chromosome 17 allele) มีขนาด 108 bp สำหรับ mutant allele (chromosome 21 allele) มีขนาด 120 bp โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60°C จากการตรวจสอบตัวอย่างควบคุมเลือดผู้หญิงปกติ พบว่าสัดส่วนของ mutant allele/wild type allele เท่ากับ 1.043±0.073 ตัวอย่างควบคุมดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์ เท่ากับ 1.486±0.107 ตัวอย่างควบคุมพลาสมาผู้หญิงปกติ เท่ากับ 0.710±0.019 ดังภาพ 2 และ ตาราง 4

การตรวจสอบก่อนคลอดกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR

อาสาสมัครหญิงตั้งครรภ์ที่เข้าร่วมโครงการมีอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 8-21 สัปดาห์ (อายุครรภ์เฉลี่ย 13.14±4.22 สัปดาห์) และอายุของหญิงตั้งครรภ์อยู่ระหว่าง 34-43 ปี (อายุเฉลี่ย 37.05±2.26 ปี) ตัวอย่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์จำนวน 29 ราย มีอัตราส่วนเท่ากับ 0.742±0.062 และอัตราส่วนของตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (mutant allele/wild type allele ของสามี) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.705±0.074 โดยผลจาก ddPCR ดังแสดงในตาราง 4 และภาพ 4 จากค่าอัตราส่วน mutant allele/wild type allele พลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ ทั้ง 29 ราย มีค่าไม่ต่างจากพลาสมาของผู้หญิงและพลาสมาของสามี สามารถแปลผลจาก NIPT ด้วยวิธี ddPCR ในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ได้ว่า ทารกในครรภ์มีโอกาสเสี่ยงต่ำต่อการเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ทั้ง 29 ตัวอย่าง และเมื่อตรวจสอบกับวิธีมาตรฐานแล้วพบว่ามีผลตรงกับวิธีมาตรฐานทุกตัวอย่าง ในการศึกษานี้ไม่พบตัวอย่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ที่ให้ผลเป็นบวกกับกลุ่มอาการดาวน์ แต่ทั้งนี้มีตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์หนึ่งรายได้คัดออกจากการทดลองเนื่องจากพบว่าเป็นการตั้งครรภ์แบบ vanishing twin



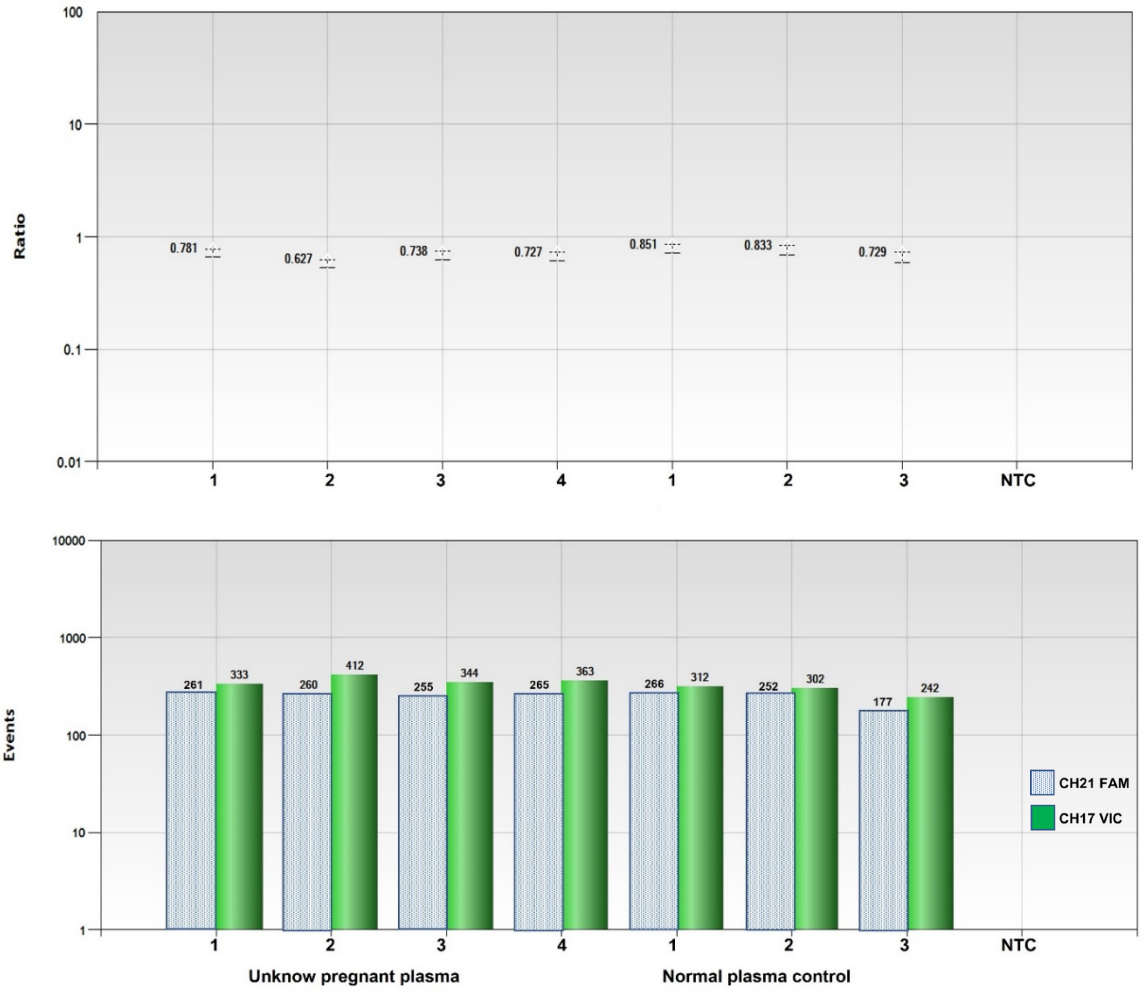
ภาพ 2 ผลของ ddPCR ของตัวอย่างเลือด โดยแสดงอัตราส่วนและจำนวนที่ให้ผลบวกต่อโพรบสำหรับ mutant allele/wild type allele จากโปรแกรม Bio-Rad QuantaSoft Analysis

ก) ผลของ ddPCR ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของกลุ่มอาการดาวน์ และเลือดของผู้หญิงปกติที่ไม่ตั้งครรภ์

ข) ผลของ ddPCR ตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาของผู้หญิงปกติที่ไม่ตั้งครรภ์

ตาราง 4 สัดส่วนของ mutant allele/wild type allele ในตัวอย่างเลือดและพลาสมา

Samples	Mutant/Wild type Ratio
T21 blood	1.486±0.107
Blood of non-pregnant normal women	1.043±0.073
Plasma of non-pregnant normal women	0.710±0.019
Negative plasma control	0.705±0.074
Pregnant plasma	0.742±0.062



ภาพ 3 ตัวอย่างผลจาก ddPCR ของตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ที่มีฟีตัสปกติโดยแสดงอัตราส่วนและจำนวนที่ให้ผลบวกต่อโพรบสำหรับ mutant allele และ wild type allele จากโปรแกรม Bio-Rad QuantaSoft Analysis

วิจารณ์

การค้นพบ cffDNA ในพลาสมาของแม่ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่ออายุครรภ์ที่มากขึ้น และหลังจากคลอดแล้ว cffDNA มีการกำจัดอย่างรวดเร็วจากพลาสมาของแม่ [18] นอกจากนี้พบว่า cffDNA มาจากเนื้อเยื่อ cytotrophoblast ของ chorionic villi เป็นแหล่งดีเอ็นเอของฟีตัสที่นำมาใช้ในการตรวจคัดกรองก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำ (NIPT) ของโรคในกลุ่มที่มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมแบบ aneuploidy โดยเฉพาะในกลุ่มอาการดาวน์เป็นโรคที่เกิดจาก trisomy 21 ที่พบได้บ่อย [19] ในอเมริกาโดย American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG) และ Maternal Fetal Medicine (MFM) Societies แนะนำให้หญิงตั้งครรภ์ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อกลุ่มอาการที่มีโครโมโซมผิดปกติตรวจสอบด้วย NIPT และตรวจยืนยันด้วยการทำคารีโอไทป์ [20] ปัจจุบันมีหลากหลายรูปแบบในการให้บริการตรวจ NIPT ซึ่งเป็นการใช้เทคโนโลยี next generation sequencing (NGS) ทั้งแบบmassively parallel shotgun sequencing (MPSS) และchromosome selective sequencing (CSS) [19-21] นอกจากนี้ยังมีการใช้ microarray quantification สำหรับการทำ NIPT [22] โดยการให้บริการมีราคาที่ค่อนข้างสูง และมีความซับซ้อนจำเป็นต้องใช้เจ้าหน้าที่มีความชำนาญเฉพาะด้านและไม่สามารถดำเนินการในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปได้ มีรายงานการศึกษาการใช้ digital PCR (dPCR) ในการตรวจ trisomy 13, 18 และ 21 ที่เป็น invasive prenatal diagnostics และ NIPT โดยมีระบบปฏิบัติการที่ใช้ต่าง ๆ กัน เช่น droplet digital PCR (ddPCR) System และ chip-based digital PCR [23-25] การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจ NIPT ของกลุ่มอาการดาวน์ด้วยเทคนิค ddPCR โดยใช้ค่าอัตราส่วนระหว่าง mutant allele/wild type allele ซึ่งในคนปกติควรมีอัตราส่วนของ mutant allele/wild type allele เข้าใกล้ 1 (2:2) ในกลุ่มอาการดาวน์อัตตราส่วนควรจะมากกว่า 1 โดยเข้าใกล้ 1.5 (3:2) ผลจากการศึกษาในตัวอย่างดีเอ็นกลุ่มควบคุมเลือดของผู้ป่วยเด็กกลุ่มอาการดาวน์และหญิงปกติมีอัตราส่วนที่ได้เป็นไปตามทฤษฎี และเป็นเช่นเดียวกันกับการศึกษาด้วย chip-based digital PCR ในการตรวจวินิจฉัยดีอ็นเอของฟีตัส [23] แต่ในการศึกษาในกลุ่มควบคุมของพลาสมาของหญิงปกติไม่ตั้งครรภ์และควบคุมเชิงลบพบอัตราส่วนเฉลี่ยน้อยกว่า 1 และในตัวอย่างพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์มีอัตราส่วนเฉลี่ยน้อยกว่า 1 เช่นกัน ซึ่งบอกได้ว่าฟีตัสในครรภ์มีโอกาสต่ำที่จะเป็นกลุ่มอาการดาวน์ ซึ่งให้ผลตรงกับผลการตรวจจากวิธีมาตรฐานโดยการทำคารีโอไทป์ จากอัตราส่วนที่ได้จากตัวอย่างพลาสมาที่มีค่าห่างจากอัตราส่วนของดีเอ็นเอจากเลือดเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนของ mutant allele/wild type allele ที่ได้น้อยกว่า 1 นี้ อาจเป็นผลมาจากการเกิด amplification bias ที่เกิดขึ้นกับ cfDNA จากพลาสมา อาจเนื่องมาจากขนาดของ cfDNA ในพลาสมาส่วนใหญ่มักพบมีขนาด 166 bp และใน cffDNA มีขนาดชิ้นส่วนที่เล็กกว่า cfDNA ซึ่งมักพบขนาด 142 bp ขนาดของชิ้นส่วนของ cfDNAนี้สัมพันธ์กับ nucleosome footprints, การเกิด chromosome packaging รวมถึงการเกิด gene expression ซึ่งในเซลล์หรือเนื้อเยื่อมีรูปแบบในการถูกตัดต่างกันได้ โดยใน cfDNA ของแม่มาจาก blood cells สำหรับ cffDNA มา placental cells [26-29] ในขณะที่ดีเอ็นเอจากเลือดเป็น genomic DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า cfDNA นอกจากนี้เพื่อเป็นเพิ่มความสำเร็จในการทำ NIPT ได้มีการศึกษาการเพิ่มสัดส่วนของ cffDNA โดยการเลือกขนาด cfDNA ให้อยู่ในช่วงที่พบมีสัดส่วนของ cffDNA มากขึ้นเพื่อลดการเกิดผลลบลวง (false negative) [30]

สำหรับการตรวจสอบกลุ่มอาการ trisomy ทั้งวิธี NGS และ วิธี ddPCR นั้นมีความแม่นยำสูง โดยมีรายงานของการเกิดผลบวกลวง (false positive) และผลลบลวงต่ำ แต่ยังคงมีรายงานการเกิดความผิดผลาดเหล่านี้เกิดขึ้นได้ในการทำ NIPT เช่นกัน ซึ่งในการเกิดผลบวกและลบลวงนั้นมีรายงานเกิดขึ้นได้หลายสาเหตุที่สำคัญคือปริมาณของ cffDNA ที่น้อยและมีสาเหตุอื่น ๆ เช่น การเกิด placental mosaicism ของเซลล์ cytotrophoblast ซึ่งเป็นแหล่งของ cfDNA ในพลาสมา โดยทำให้เกิดได้ทั้งผลบวกและลบลวง และมีรายงานการเกิด unbalance translocation ของ chromosome 21 ทำให้เกิดผลลบลวงได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดผลบวกลวงเพิ่มขึ้นในการตั้งครรภ์ vanishing twin ถึงแม้จะใช้ NGS ในการตรวจสอบ NIPT [31-36] ดังนั้นในตัวอย่างที่พบว่าเป็น vanishing twin ในการศึกษาครั้งนี้

จึงได้คัดออกจากการศึกษา ในการศึกษานี้เนื่องจากตัวอย่าง cfDNA ของหญิงตั้งครรภ์ที่ศึกษาครั้งนี้มีผลการตรวจสอบฟีตัสไม่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ทุกตัวอย่าง ดังนั้นควรจะมีการเก็บตัวอย่างจำนวนมากขึ้นในการศึกษาต่อไปสำหรับการตรวจสอบก่อนคลอดแบบไม่รุกล้ำในกลุ่มอาการดาวน์ด้วยเทคนิค ddPCR ซึ่งจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบตัวอย่างฟีตัสที่มีความเสี่ยงสูงเป็นกลุ่มอาการดาวน์และจะได้ตรวจสอบอัตราส่วนของตัวอย่างพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ที่ฟีตัสจะเป็นกลุ่มอาการดาวน์ นอกจากนี้การเพิ่มขั้นตอนในการเลือกขนาด cfDNA และการออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสอบ mutant allele ใหม่ เพื่อลดการเกิด amplification bias น่าจะทำให้อัตราส่วนของ mutant allele/wild type allele ของ cfDNA เข้าใกล้อัตราส่วนของดีเอ็นเอจากเลือด

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาการตรวจสอบกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี ddPCR โดยพิจารณาจากอัตราส่วนของ mutant allele (chromosome 21) ต่อ wild type allele (chromosome 17; reference chromosome) พบว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของคนปกติมีอัตราส่วนเฉลี่ย คือ 1.043±0.073 ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์มีอัตราส่วนเฉลี่ย เท่ากับ 1.486±0.107 และเมื่อนำวิธีการที่ได้มาตรวจสอบในพลาสมาคนปกติแบ่งเป็นในผู้หญิงที่ไม่ตั้งครรภ์ และผู้ชายปกติมีอัตราส่วน คือ 0.710±0.019 และ 0.705±0.074 ตามลำดับ และผลของการตรวจ cffDNA ของพลาสมาหญิงตั้งครรภ์พบว่ามีอัตราส่วนที่เป็นเช่นเดียวกับในพลาสมาของคนปกติ คือ 0.742±0.062 ดังนั้นเทคนิค ddPCR สามารถตรวจสอบทารกในครรภ์มีความเสี่ยงต่ำที่จะเป็นกลุ่มอาการดาวน์ได้ โดยให้ผลเช่นเดียวกันกับวิธีมาตรฐาน แต่เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ยังไม่พบฟีตัสของหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นกลุ่มอาการดาวน์ อย่างไรก็ตามคาดการณ์ว่าในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ที่ฟีตัสเป็นกลุ่มอาการดาวน์น่าจะมีอัตราส่วนของ mutant allele ต่อ wild type allele มากกว่า 1 ซึ่งควรมีตัวอย่างในการศึกษาจำนวนมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับจากมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา FF65-RIM0053 จากกองทุนส่งเสริม ววน. และขอขอบพระคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Pangkanon S, Layangool T, Niramis R, Keyurapan B, Intakorn P, Fuengfoo A, et al. Multidisciplinary approach in Down syndrome. Thai Pediatr J. 2008;15(2):227-31.

[2] Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". J Biomed Sci. 2015;22(1):41. doi: 10.1186/s12929-015-0138-y.

[3] Mai CT, Isenburg JL, Canfield MA, Meyer RE, Correa A, Alverson CJ, Lupo PJ, Riehle-Colarusso T, Cho SJ, Aggarwal D, Kirby RS; National Birth Defects Prevention Network. National population-based estimates for major birth defects, 2010-2014. Birth Defects Res. 2019;111(18):1420-1435. doi: 10.1002/bdr2.1589.

[4] Jaruratanasirikul S, Kor-Anantakul O, Chowvichian M, Limpitikul W, Dissaneevate P, Intharasangkanawin N, Sattapanyo A, Pathompanitrat S, Sriplung H. A population-based study of prevalence of Down syndrome in Southern Thailand. World J Pediatr. 2017;13(1):63-69. doi: 10.1007/s12519-016-0071-5.

[5] Wongkrajang P, Jittikoon J, Sangroongruangsri S, Talungchit P, Ruangvutilert P, Panchalee T, Chaikledkaew U. Prenatal screening tests and prevalence of fetal aneuploidies in a tertiary hospital in Thailand. PLoS One. 2023;18(4):e0284829. doi: 10.1371/journal.pone.0284829.

[6] Beazoglou T, Heffley D, Kyriopoulos J, Vintzileos A, Benn P. Economic evaluation of prenatal screening for Down syndrome in the U.S.A. Prenat Diagn 1998;18:1241-52.

[7] ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities. Obstet Gynecol. 2001;97: suppl 1-12.

[8] Pattanaphesaj J, Tonmukayakul U, Teerawattananon Y. Cost-benefit Analysis of Prenatal Screening and Diagnosis for Down Syndrome in Thailand. J Health Sci 2017;21(4):667-84.

[9] Alfirevic Z, Neilson JP. Antenatal screening for Down's syndrome. BMJ. 2004;329(7470):811-2. doi: 10.1136/bmj.329.7470.811.

[10] Benn PA. Advances in prenatal screening for Down syndrome: I. general principles and second trimester testing. Clin Chim Acta. 2002;323(1-2):1-16. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00186-9.

[11] Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe?. Am J Obstet Gynecol 2004;191(2):607-15.

[12] ACOG Practice Bulletin No. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. Obstet Gynecol 2007; 109:217-27.

[13] Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015;45:16–26.

[14] Stomornjak-Vukadin M, Kurtovic-Basic I, Mehinovic L, Konjhodzic R. Combined use of cytogenetic and molecular methods in prenatal diagnostics of chromosomal abnormalities. Acta Inform Med. 2015;23(2):68-72. doi: 10.5455/aim.2015.23.68-72.

[15] Gekas J, van den Berg DG, Durand A, Vallée M, Wildschut HI, Bujold E, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. Eur J Hum Genet. 2011;19(1):3-9. doi: 10.1038/ejhg.2010.138.

[16] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 1997;350(9076):485-7. doi: 10.1016/S0140-6736(97)02174-0.

[17] Rafi I, Hill M, Hayward J, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing: use of cell-free fetal DNA in Down syndrome screening. Br J Gen Pract. 2017;67(660):298-299. doi: 10.3399/bjgp17X691625.

[18] ACOG American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 545: noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Obstet Gyn. 2012;120:1532-4

[19] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(42):16266-71. doi: 10.1073/pnas.0808319105.

[20] Mersy E, Smits LJ, van Winden LA, de Die-Smulders CE; South-East Netherlands NIPT Consortium; Paulussen AD, Macville MV, Coumans AB, Frints SG. Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. Hum Reprod Update. 2013;19(4):318-29. doi: 10.1093/humupd/dmt001.

[21] Chitty LS, Lo YM. Noninvasive Prenatal Screening for Genetic Diseases Using Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5(9):a023085. doi: 10.1101/cshperspect.a023085.

[22] Stokowski R, Wang E, White K, Batey A, Jacobsson B, Brar H, et al. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. Prenat Diagn. 2015;35(12):1243-6. doi: 10.1002/pd.4686.

[23] Nykel A, Kaszkowiak M, Fendler W, Gach A. Chip-Based Digital PCR Approach Provides A Sensitive and Cost-Effective Single-Day Screening Tool for Common Fetal Aneuploidies-A Proof of Concept Study. Int J Mol Sci. 2019;20(21):5486. doi: 10.3390/ijms20215486.

[24] Tan C, Chen X, Wang F, Wang D, Cao Z, Zhu X, et al. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies. Analyst. 2019;144:2239–2247.

[25] Dai P, Yang Y, Zhao G, Gu Z, Ren H, Hu S, et al. A dPCR-NIPT assay for detections of trisomies 21, 18 and 13 in a single-tube reaction-could it replace serum biochemical tests as a primary maternal plasma screening tool? J Transl Med. 2022;20(1):269. doi: 10.1186/s12967-022-03455-y.

[26] Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. Clin Chem. 2010;56(8):1279-86. doi: 10.1373/clinchem.2010.144188.

[27] Yu SC, Chan KC, Zheng YW, Jiang P, Liao GJ, Sun H, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(23):8583-8. doi: 10.1073/pnas.1406103111.

[28] Hu P, Liang D, Chen Y, Lin Y, Qiao F, Li H, Wang T, Peng C, Luo D, Liu H, Xu Z. An enrichment method to increase cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study. J Transl Med. 2019;17(1):124. doi: 10.1186/s12967-019-1871-x.

[29] Chiu RWK, Lo YMD. Cell-free fetal DNA coming in all sizes and shapes. Prenat Diagn. 2021;41(10):1193-1201. doi: 10.1002/pd.5952. Epub 2021 May 7.

[30] Qi T, Pan M, Shi H, Wang L, Bai Y, Ge Q. Cell-Free DNA Fragmentomics: The Novel Promising Biomarker. Int J Mol Sci. 2023;24(2):1503. doi: 10.3390/ijms24021503.

[31] Smith M, Lewis KM, Holmes A, Visootsak J. A Case of False Negative NIPT for Down Syndrome-Lessons Learned. Case Rep Genet. 2014;2014:823504. doi: 10.1155/2014/823504.

[32] Lebo RV, Novak RW, Wolfe K, Michelson M, Robinson H, Mancuso MS. Discordant circulating fetal DNA and subsequent cytogenetics reveal false negative, placental mosaic, and fetal mosaic cfDNA genotypes. J Transl Med. 2015;13:260. doi: 10.1186/s12967-015-0569-y.

[33] Van Opstal D, Srebniak MI, Polak J, de Vries F, Govaerts LC, Joosten M, Go AT, et al. False Negative NIPT Results: Risk Figures for Chromosomes 13, 18 and 21 Based on Chorionic Villi Results in 5967 Cases and Literature Review. PLoS One. 2016;11(1):e0146794. doi: 10.1371/journal.pone.0146794.

[34] Xu HH, Dai MZ, Wang K, Zhang Y, Pan FY, Shi WW. A rare Down syndrome foetus with de novo 21q;21q rearrangements causing false negative results in non-invasive prenatal testing: a case report. BMC Med Genomics. 2020;13(1):96. doi: 10.1186/s12920-020-00751-8.

[35] Liehr T. False-positives and false-negatives in non-invasive prenatal testing (NIPT): what can we learn from a meta-analyses on > 750,000 tests? Mol Cytogenet. 2022;15(1):36. doi: 10.1186/s13039-022-00612-2.

[36] Kleinfinger P, Luscan A, Descourvieres L, Buzas D, Boughalem A, Serero S, et al. Noninvasive Prenatal Screening for Trisomy 21 in Patients with a Vanishing Twin. Genes (Basel). 2022;13(11):2027. doi: 10.3390/genes13112027.