วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 23 ฉบับที่ 5 กันยายน - ตุลาคม 2557

Journal of Health Science
Vol. 23 No. 5, September - October 2014

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค Multiplex Fluorescent Polymerase Chain Reaction

อารีรัตน์ ขอไชย วท.ม.*
บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค ปร.ด.**
สิริภากร แสงกิจพร วท.ม.*
สาวิตรี ด้วงเรือง วท.บ.*
ชลลดา ยอดทัพ วท.บ.*
สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ปร.ด.***
อังคณา หิรัญสาลี ปร.ด.*
** สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*
*** ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี*
**** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

บทคัดย่อ กลุ่มอาการดาวน์เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยที่สุด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR) อาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 บนโครโมโซมแท่งที่ 21 และวิเคราะห์ PCR product โดยหลักการ capillary electrophoresis ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ การแปลผลพิจารณาจากรูปแบบ peak ของ STR แต่ละตำแหน่งร่วมกัน ตัวอย่างคนปกติรายงาน 2 peak ที่มีสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟเป็น 1:1 หรือรายงาน 1 peak ส่วนตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์รายงาน 3 peak ที่มีสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟเป็น 1:1:1, รายงาน 2 peak ที่มีสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟเป็น 2:1 หรือรายงาน 1 peak จากการศึกษาตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ 32 ราย และคนปกติ 50 ราย พบว่าทุกรายให้ผลการตรวจวินิจฉัยตรงกับการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม นับว่าเทคนิคนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ และทราบผลการตรวจรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็นประโยชน์ต่อการสนับสนุนการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคกลุ่มอาการดาวน์

คำสำคัญ: **กลุ่มอาการดาวน์, เทคนิค multiplex fluorescent PCR, การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ**

บทนำ

กลุ่มอาการดาวน์หรือดาวน์ซินโดรมเป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มโรคภาวะปัญญาอ่อน มีอุบัติการณ์การเกิดประมาณ 1 คนต่อทารกแรกเกิดมีชีพ 1,000 คน[1] เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมคู่ที่ 21 ซึ่งมีหลายรูปแบบ สาเหตุที่พบบ่อยที่สุดคือ การมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกินมา 1 แท่งในทุกเซลล์ของร่างกาย ความผิดปกติแบบนี้เรียกว่า trisomy 21 พบร้อยละ 95 สาเหตุรองลงมาเรียกว่า robertsonian translocation คือการมีส่วนของโครโมโซมที่ 21 เกินมาจากการเคลื่อนย้ายไปเชื่อมติดกับโครโมโซมชนิดที่เป็น acrocentric chromosome เช่น โครโมโซมที่ 14 หรือ 21 เป็นต้น

ซึ่งพบร้อยละ 4 ส่วนสาเหตุที่พบได้น้อยที่สุดคือ ภาวะ mosaicism ซึ่งผู้ป่วยมีทั้งเซลล์ปกติที่มีโครโมโซม 46 แท่ง และเซลล์ผิดปกติชนิด trisomy 21 อยู่ในคนเดียว กัน พบร้อยละ 1[1,2]

กลุ่มอาการดาวน์เป็นความผิดปกติแต่กำเนิด ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีลักษณะที่คล้ายกันมากกว่าพี่น้องท้อง เดียวกัน เช่น มีลักษณะใบหน้ากลม ศีรษะแบนและ ตาเฉียงขึ้น ดั้งจมูกแบน ลิ้นยื่นออกมา กล้ามเนื้ออ่อน ปวกเปียก มือสั้นและกว้าง มีเส้นลายมือขวาง นิ้ว หัวแม่มือและนิ้วชี้ของนิ้วเท้าอยู่ห่างกัน ปัญหาที่สำคัญ ที่สุดของกลุ่มอาการดาวน์ก็คือ ภาวะปัญญาอ่อนใน ระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน และมักมีโรคหัวใจ พิการแต่กำเนิด โรคลำไส้อุดตันแต่กำเนิด มะเร็ง เม็ดเลือดขาว และอัลไซเมอร์ จึงต้องได้รับการดูแล อย่างใกล้ชิดตั้งแต่แรกเกิด[2,3]

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีทั้งการตรวจ คัดกรองและการตรวจยืนยัน การตรวจคัดกรอง ได้แก่ การตรวจคัดกรองจากอายุของหญิงตั้งครรภ์, การตรวจ คัดกรองโดยใช้อัลตราซาวน์เพื่อวัดความหนาของผิวหนัง บริเวณหลังคอทารก และการตรวจคัดกรองสารชีวเคมี โดยการเจาะเลือดของหญิงตั้งครรภ์[4-7] การตรวจ ยืนยันความผิดปกติทำโดยการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่แน่นอน ทำได้ที่โรงพยาบาลขนาด ใหญ่และโรงเรียนแพทย์ทุกแห่ง นิยมตรวจในหญิง ตั้งครรภ์ที่มีอายุมากกว่า 35 ปีขึ้นไป เนื่องจากมีความ เสี่ยงสูงที่ทารกในครรภ์จะมีโครโมโซมผิดปกติ การ วิเคราะห์โครโมโซมใช้ระยะเวลาการตรวจนานประมาณ 2-3 สัปดาห์ เนื่องจากต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ และ ต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการตรวจและอ่านผล มีราคาแพงประมาณการทดสอบละ 3,000-5,000 บาท จึงเป็นการยากที่จะขยายบริการไปสู่ห้องปฏิบัติการ ระดับต่าง ๆ[8] การตรวจวินิจฉัยระดับโมเลกุลเป็นอีกทาง เลือกหนึ่งที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ ก่อนคลอด มี 2 เทคนิค ได้แก่ fluorescent in situ hybridization (FISH)[9-11] และ polymerase chain reaction (PCR)[12-16] ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว และไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ สำหรับการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้พัฒนาการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญ คือ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบน โครโมโซมที่ 21 บริเวณลำดับเบสซ้ำต่อเนื่องขนาดสั้น ๆ (short tandem repeat; STR) ที่มีความหลากหลาย ทางพันธุกรรมสูง และการตรวจวิเคราะห์ PCR product โดยหลักการ capillary electrophoresis ด้วยเครื่อง วิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ผลการศึกษาวิจัยที่ได้ นำไปสู่การพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจ วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม และสนับสนุนให้มีการนำ เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วิธีการศึกษา

1. การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR

1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดชนิด EDTA blood จำนวน 82 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ที่มีความผิดปกติ แบบ trisomy 21 จำนวน 32 ตัวอย่าง และตัวอย่าง คนปกติจำนวน 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล รามาธิบดี และสถาบันราชานุกูล ทุกตัวอย่างผ่านการ ตรวจยืนยันความผิดปกติโดยการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม ส่วนตัวอย่างคนปกติเป็นตัวอย่างของสามีภรรยาที่เข้า ร่วมโครงการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียกับ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตัวอย่างทั้งหมดถูกเตรียม DNA โดยน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin Blood (Macherey-nagel, Germany) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของ DNA ที่สามารถจับกับ silica membrane ได้

1.2 วิธีการ

เทคนิคนี้อาศัย primer 3 คู่ สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 บนโครโมโซม 21 โดยทำการติดฉลากที่

ปลาย 5' ของ primer แต่ละคู่ด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) การเตรียม PCR master mix ปริมาตรรวม 25 μL ประกอบด้วยน้ำยา 1X PCR Buffer (Applied Biosystems, USA), 200 μM dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 0.16 μM primer D21S11, 1.6 μM primer D21S1411, 0.16 μM primer D21S1413, 0.2 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, USA), น้ำกลั่น และ 50 ng DNA ทำปฏิกิริยา PCR โดยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Gene Cycler (Bio-Rad, USA) โดยปรับการทำงานของ Enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerase ที่ 95°C นาน 15 นาที จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA 40 รอบ โดย denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 59°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที และ final extension ที่ 60°C นาน 10 นาที

เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการวิเคราะห์ PCR product โดยผสม PCR product 0.25 μL กับ Sample Loading Solution 40 μL (Applied Biosystems, USA) และ DNA size standard-600 0.5 μL (Applied Biosystems, USA) วิเคราะห์ PCR product โดยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, USA) อาศัยหลักการ capillary electrophoresis

ข้อมูลทั้งหมดถูกส่งไปเก็บไว้ในหน่วยความจำของคอมพิวเตอร์ มีโปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ผลการตรวจออกมาเป็น electropherogram โดยแสดง fluorescence intensity ในแนวแกน Y และขนาดของ DNA ในแนวแกน X มี software สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ peak

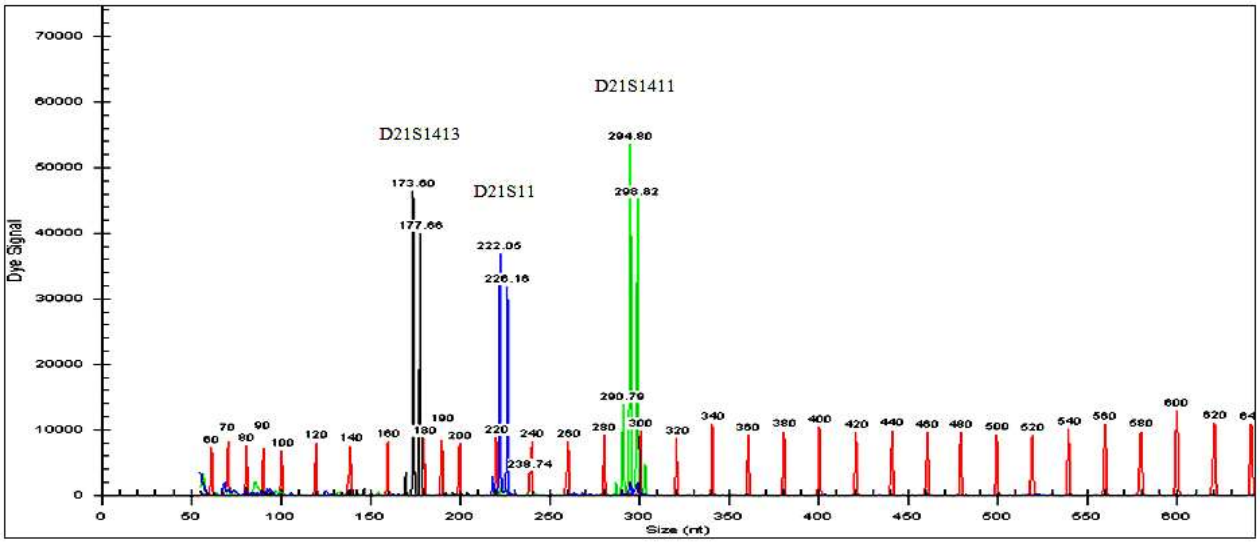
การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ หาก DNA ที่นำมาวิเคราะห์เป็น DNA ของคนปกติสามารถรายงานได้ 2 รูปแบบ แบบที่ 1 กรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นเป็น heterozygous allele จะรายงานเป็น 2 peak ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยมีความสูงของ peak พอๆ กันเป็นสัดส่วน 1:1 และแบบที่ 2 กรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นเป็น homozygous allele จะรายงานเพียง 1 peak โดยมีความสูงของ peak เป็น 2 เท่าของกรณีแรก ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับ DNA ของกลุ่มอาการดาวน์เมื่อนำมาวิเคราะห์สามารถรายงานได้ 3 รูปแบบ แบบที่ 1 กรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นเป็น triallelic จะรายงาน 3 peak ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยมีความสูงของ peak พอๆ กันเป็นสัดส่วน 1:1:1 แบบที่ 2 กรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นเป็น diallelic จะรายงาน 2 peak ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยมีความสูงของ peak เป็นสัดส่วน 2:1 และแบบที่ 3 กรณีที่ STR ตำแหน่งนั้นเป็น monoallelic จะรายงานเพียง 1 peak โดยมีความสูงของ peak เป็น 3 เท่าของแบบที่ 1 ดังแสดงในภาพที่ 2[12]

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ กรณี STR ตำแหน่งนั้นเป็น 2 peak ให้นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของ peak ที่สูงกว่าหารด้วยค่าพื้นที่ใต้กราฟของ peak ที่เตี้ยกว่า หากสัดส่วนปริมาณ DNA มีค่าอยู่ระหว่าง 1.0 ถึง 1.4

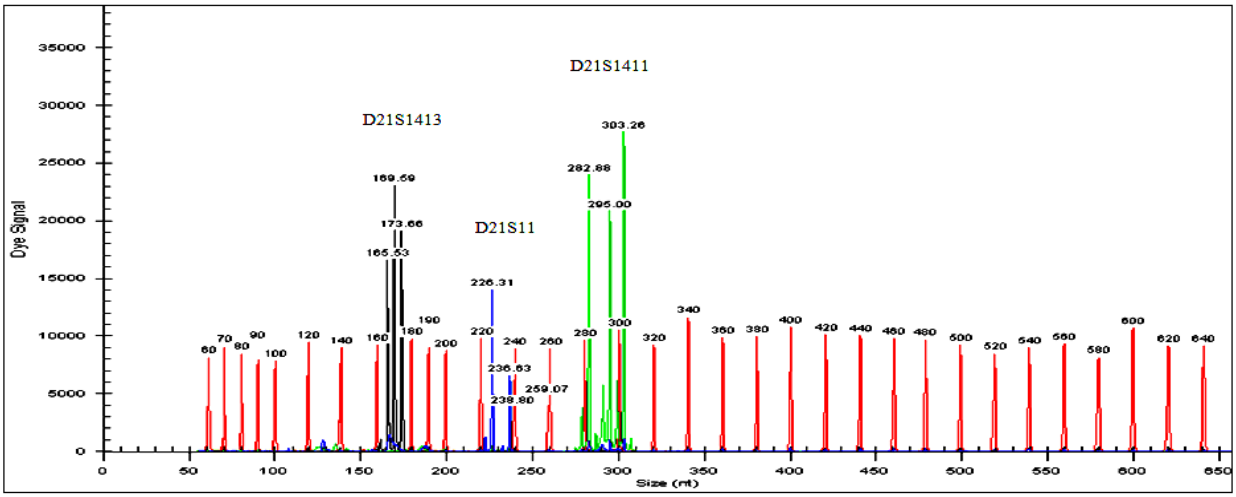
ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer สำหรับการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของกลุ่มอาการดาวน์

Primers	Sequence	Heterozygosity	reference
D21S11 F	D4-5'-TATgTgAgTCAATTCCCCAAgTgA-3'	0.93	12
D21S11 R	5'-gTTgTATTAgTCAATgTTCTCCAg-3'		
D21S1411 F	D3-5'-ATgATgAATgCATAgATggATg-3'	0.93	12
D21S1411 R	5'-AATgTgTgTCCTTCCAggC-3'		
D21S1413 F	D2-5'-TTgCAgggAAACCACAgTT-3'	0.87	13
D21S1413 R	5'-TCCTTggAATAAATTCCCgg-3'		

ภาพที่ 1 ตัวอย่าง electropherogram ของคนปกติ แสดง heterozygous allele บน STR ทุกตำแหน่ง



ภาพที่ 2 ตัวอย่าง electropherogram ของกลุ่มอาการดาวน์ แสดง triallelic pattern ตำแหน่ง D21S1413 และ D21S1411 และ diallelic pattern ตำแหน่ง D21S11



แปลผลเป็นปกติ หากสัดส่วนปริมาณ DNA มีค่า >1.8 แปลผลเป็นกลุ่มอาการดาวน์ หากสัดส่วนปริมาณ DNA มีค่าอยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 1.7 ไม่สามารถแปลผลได้ว่าเป็นปกติหรือกลุ่มอาการดาวน์ ต้องแปลผลร่วมกับ STR ตำแหน่งอื่น และหากสัดส่วนปริมาณ DNA มีค่า <0.25 หรือ >4.0 ให้ทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ[15,16]

2. การประเมินความถูกต้องของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

2.1 ศึกษาความถูกต้องของเทคนิค

เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR กับการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม ในตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ 32 ตัวอย่าง

2.2 ศึกษาความแม่นยำของเทคนิค

นำตัวอย่างคนปกติ 1 ตัวอย่าง ที่มี STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 เป็น heterozygous allele ทุกตำแหน่ง มาทำการวิเคราะห์ซ้ำ โดยทำซ้ำในคราวเดียวกัน (within-run) 5 ครั้ง และทำต่าง

คราวกัน (between-run) เป็นเวลา 5 วัน วันละ 1 ครั้ง

ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างคนปกติ 50 ตัวอย่าง พบว่า STR ตำแหน่ง D21S11 แสดง heterozygous allele 45 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.0-1.4 ตำแหน่ง D21S1411 แสดง heterozygous allele 47 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.0-1.4 และตำแหน่ง D21S1413 แสดง heterozygous allele 33 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.0-2.3 ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์ในตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ 32 ตัวอย่าง พบว่า STR ตำแหน่ง D21S11 แสดง diallelic pattern 15 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.6-2.5 ตำแหน่ง D21S1411 แสดง diallelic pattern 19 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.6-3.2 และตำแหน่ง D21S1413 แสดง diallelic pattern 18 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.3-3.2 ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

เมื่อนำค่าสัดส่วนปริมาณ DNA ของ STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 ไป plot กราฟระหว่างค่าสัดส่วนปริมาณ DNA ในแนวแกน Y และจำนวนตัวอย่างของคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์ในแนวแกน X เพื่อดูการกระจายข้อมูลระหว่างตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม พบว่า ตำแหน่ง D21S11 และ D21S1411 มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA ระหว่างตัวอย่างคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4 ตามลำดับ ส่วนตำแหน่ง D21S1413 ค่าสัดส่วนปริมาณ DNA ระหว่างตัวอย่างทั้งสองกลุ่มทาบเกี่ยวกัน ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ตัวอย่างคนปกติ 16 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA>1.4 และตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ 8 ตัวอย่าง มีค่าสัดส่วนปริมาณ DNA<1.8 ดังแสดงในภาพที่ 5

การประเมินความถูกต้องของเทคนิค พิจารณาจาก

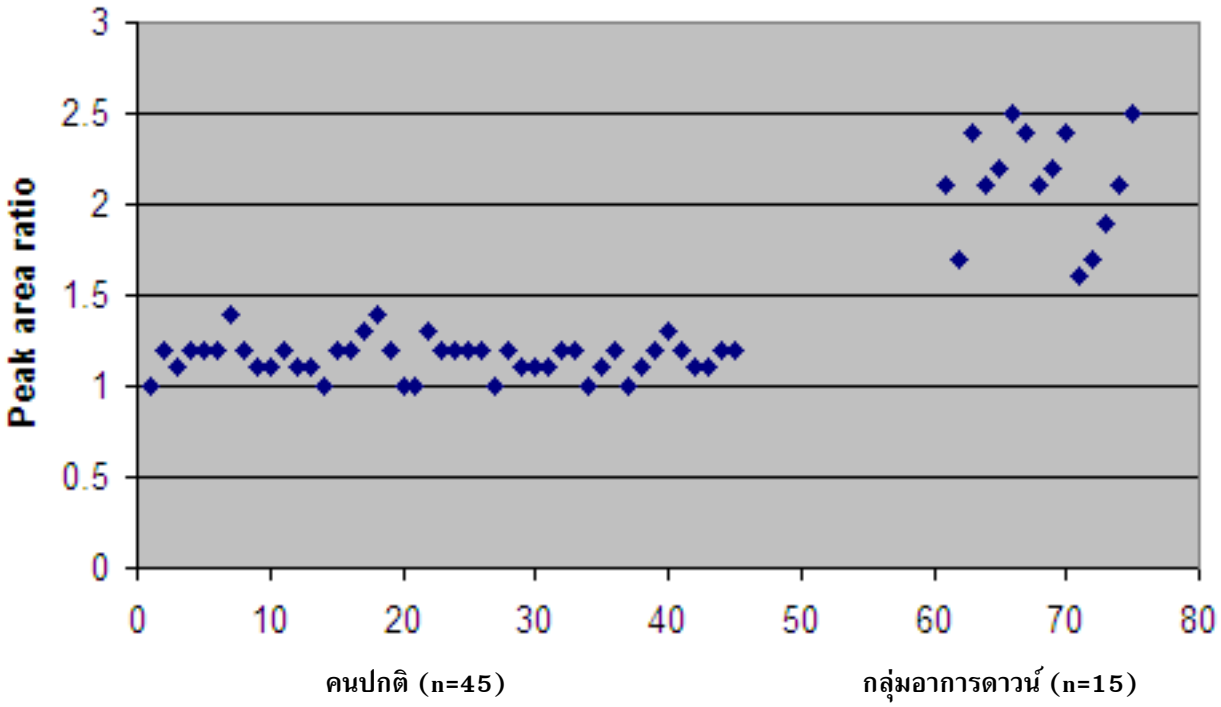
ตารางที่ 2 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม และสัดส่วนปริมาณ DNA ของ STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 ในตัวอย่างคนปกติ (n = 50)

STR marker	Homozygous allele (n)	Heterozygous allele (n)	Ratio of peak area in heterozygous samples		
			Mean	SD	Range
D21S11	5	45	1.2	0.1	1.0-1.4
D21S1411	3	47	1.2	0.1	1.0-1.4
D21S1413	17	33	1.5	0.4	1.0-2.3

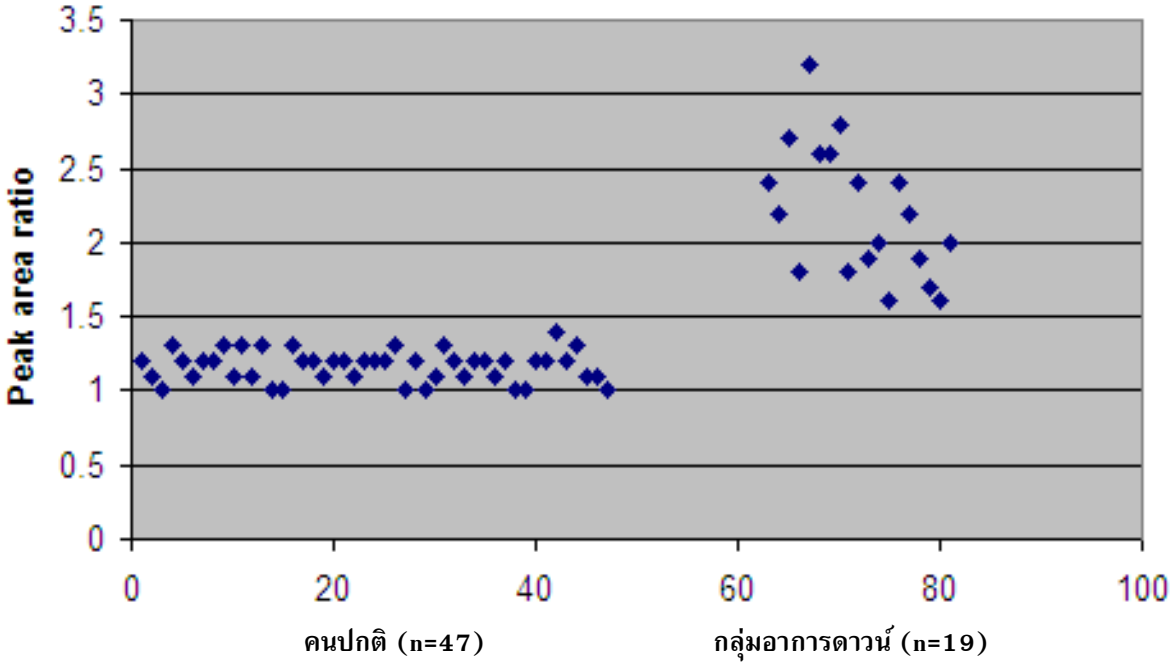
ตารางที่ 3 แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม และสัดส่วนปริมาณ DNA ของ STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 ในตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ (n = 32)

STR marker	Monoallelic(n)	Diallelic(n)	Triallelic(n)	Ratio of peak area in diallelic trisomic samples		
				Mean	SD	Range
D21S11	2	15	15	2.1	0.3	1.6-2.5
D21S1411	1	19	12	2.2	0.4	1.6-3.2
D21S1413	6	18	8	2.1	0.6	1.3-3.2

ภาพที่ 3 กราฟแสดงการกระจายข้อมูลสัดส่วนปริมาณ DNA บริเวณ STR ตำแหน่ง D21S11 ในตัวอย่างคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์



ภาพที่ 4 กราฟแสดงการกระจายข้อมูลสัดส่วนปริมาณ DNA บริเวณ STR ตำแหน่ง D21S1411 ในตัวอย่างคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์

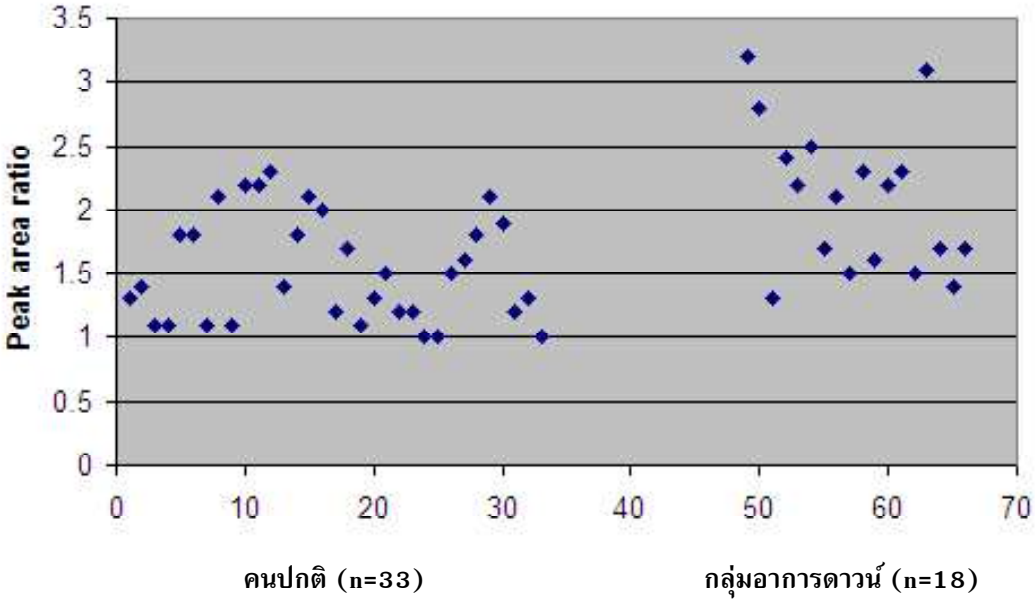


ความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่า การตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR ให้ผลตรงกับการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมทุกราย สำหรับการศึกษาความแม่นยำโดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างคนปกติที่มี STR ตำแหน่ง D21S11, D21S1411 และ D21S1413 เป็น heterozygous allele ทุกตำแหน่ง วิเคราะห์ซ้ำในคราวเดียวกัน 5 ซ้ำ และต่างคราวกันเป็นเวลา 5 วัน วันละ 1 ครั้ง ค่าสัดส่วนปริมาณ DNA แต่ละ STR marker มีค่า %CV 1.35-2.24 ดังแสดงในตารางที่ 4

วิจารณ์

กลุ่มอาการดาวน์เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งวิธีมาตรฐานในการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมเป็นการตรวจวิเคราะห์ karyotype เพื่อค้นหาสารพันธุกรรมที่เกินมาของโครโมโซมแท่งที่ 21 ดังนั้นผลการตรวจที่มีความถูกต้องและแม่นยำ จะนำไปสู่การให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุกรรมที่เหมาะสม เพื่อประกอบการตัดสินใจในการยุติการตั้งครรภ์ของคู่สามีภรรยา แต่เนื่องจากหน่วยงานที่มีศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมมีเฉพาะโรงพยาบาลขนาดใหญ่และโรงเรียนแพทย์เท่านั้น จำนวน

ภาพที่ 5 แสดงการกระจายข้อมูลสัดส่วนปริมาณ DNA บริเวณ STR ตำแหน่ง D21S1413 ในตัวอย่างคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์



ตารางที่ 4 แสดงค่า %CV ของสัดส่วนปริมาณ DNA บริเวณ STR แต่ละตำแหน่ง จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน โดยวิเคราะห์ซ้ำในคราวเดียวกัน 5 ครั้ง และต่างคราวกัน เป็นเวลา 5 วัน วันละ 1 ครั้ง

	%CV		
	D21S11	D21S1411	D21S1413
Within-run (n=5)	1.76	1.73	1.35
Between-run (n=5)	1.41	1.86	2.24

บุคลากรที่ปฏิบัติงานจึงไม่เพียงพอต่อภาระงานที่เพิ่มขึ้น

การศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม ทั้งยังสะดวกในการใช้งาน รวดเร็วและมีความจำเพาะสูง[17-21]โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ STR 3 ตำแหน่งบนโครโมโซม 21 ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยตำแหน่ง D21S1411 และ D21S1413 อยู่บริเวณวิกฤติของกลุ่มอาการดาวน์ มีการศึกษา STR 2 ตำแหน่งนี้อย่างแพร่หลายในการตรวจวินิจฉัย trisomy 21 ส่วนตำแหน่ง D21S11 อยู่นอกบริเวณวิกฤติของกลุ่มอาการดาวน์ นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมและงานตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล[12-23]

จากการศึกษาในตัวอย่างคนปกติ 50 ตัวอย่าง มี 25 ตัวอย่างที่ electropherogram เป็น heterozygous allele ใน STR ทั้ง 3 ตำแหน่ง ส่วนที่เหลืออีก 25 ตัวอย่าง electropherogram เป็น heterozygous allele ใน STR เพียง 2 ตำแหน่ง ส่วน STR อีก 1 ตำแหน่งเป็น homozygous allele สำหรับในตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ 32 ตัวอย่าง มี 23 ตัวอย่างที่ electropherogram เป็นแบบ triallelic ใน STR อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง, มี 3 ตัวอย่างที่ electropherogram เป็นแบบ diallelic ใน STR ทั้ง 3 ตำแหน่ง และมี 6 ตัวอย่างที่ electropherogram มี STR เป็นแบบ diallelic และ monoallelic ตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ที่มี STR เป็นแบบ triallelic สามารถแปลผลการตรวจได้ง่าย เนื่องจาก electropherogram เป็น 3 peak ชัดเจน ส่วนตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ที่มี STR เป็นแบบ diallelic ผลจาก electropherogram เป็น 2 peak มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่มีสัดส่วนปริมาณ DNA อยู่ระหว่าง 1.3 ถึง 1.7 ซึ่งปรากฏใน STR ตำแหน่ง D21S11 จำนวน 3 ตัวอย่าง ตำแหน่ง D21S1411 จำนวน 3 ตัวอย่าง และตำแหน่ง D21S1413 จำนวน 8 ตัวอย่าง จึงยากที่จะแปลผลว่าเป็นคนปกติหรือกลุ่มอาการดาวน์หากพิจารณาจาก STR ตำแหน่งเดียว

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของ STR แต่ละตำแหน่งในตัวอย่างคนปกติที่เป็นแบบ heterozygous allele และกลุ่มอาการดาวน์ที่มีลักษณะเป็น diallelic pattern เมื่อพิจารณาผลการ plot กราฟในตัวอย่างทั้งสองกลุ่มพบว่า สัดส่วนปริมาณ DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ D21S11 และ D21S1411 ระหว่างคนปกติและกลุ่มอาการดาวน์มีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจน ไม่ทาบเกี่ยวกัน แสดงว่า primer D21S11 และ D21S1411 มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาสูง ส่วนการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ D21S1413 พบว่าในคนปกติ 24 ราย มี 9 ราย ที่มีสัดส่วนปริมาณ DNA>1.7 ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มอาการดาวน์ ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาวะ multiplex PCR ที่ยังไม่เหมาะสม จึงต้องระมัดระวังในการแปลผล และอาศัยการแปลผลร่วมกันระหว่าง STR ทั้ง 3 ตำแหน่ง หาก 2 ใน 3 ตำแหน่งให้ผลตรงกันก็สามารถแปลผลได้[18] อย่างไรก็ตามการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างแต่ละรายจะต้องแปลผลร่วมกันทุก STR marker ในการศึกษานี้ทั้งในตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์และตัวอย่างคนปกติ จึงไม่มีตัวอย่างรายใดที่ไม่สามารถแปลผลได้

เทคนิคที่พัฒนาขึ้นผ่านการประเมินความถูกต้องตามระบบคุณภาพ ก่อนที่จะนำไปสู่การใช้งานทางห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาจากความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ทุกรายให้ผลตรงกับการตรวจวิเคราะห์โครโมโซม ผลการศึกษาความแม่นยำพบว่า การวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำในคราวเดียวกัน และต่างคราวกัน มีค่า %CV 1.35-2.24 แสดงว่าเทคนิค multiplex fluorescent PCR เป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และมีความแม่นยำสูง ราคาไม่แพง ประมาณการทดสอบละ 350 บาท กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูง ทราบผลการตรวจรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีได้ง่าย หากเปรียบเทียบกับเทคนิค fluorescent in situ hybrid-

ization (FISH) ซึ่งเป็นอีกเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าเทคนิค FISH และ PCR ใช้ในการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเหมือนกัน แต่เทคนิค FISH มีความไวน้อยกว่า[24] ราคาแพงกว่าประมาณ 10 เท่า และใช้ระยะเวลาตรวจวิเคราะห์นานประมาณ 2 วัน[25]

อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์โครโมโซมผิดปกติโดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR อาจพบปัญหาการตรวจยีนไม่ครบ (allele drop out; ADO) ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณ DNA น้อย เช่น ตัวอย่างเซลล์เดียว เป็นต้น สำหรับการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ กรณีวิเคราะห์ในตัวอย่าง mosaic ที่มีเซลล์ผิดปกติชนิด trisomy 21 ในปริมาณน้อยมาก ๆ อาจพบการเกิด ADO ได้ ทำให้แปลผลการตรวจผิดพลาด[26] การพัฒนาการตรวจแบบ multiplex PCR ให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณ DNA ของ STR marker ได้มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง และแปลผลโดยพิจารณาร่วมกันทุกตำแหน่ง จะช่วยลดความเสี่ยงในการแปลผลผิดพลาด ในการศึกษานี้ไม่ได้นำตัวอย่าง mosaic มาศึกษาร่วมด้วย เนื่องจากเป็นความผิดปกติที่พบไม่บ่อย จึงหาตัวอย่างได้ยาก ในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างดังกล่าวเพื่อให้ครอบคลุมความผิดปกติทุกชนิดของกลุ่มอาการดาวน์ นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยศึกษาในตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเลือดของผู้ป่วยโดยตรง หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์ของทารกที่ได้จากการเก็บตัวอย่างเนื้อรก (chorionic villus sampling) การเจาะน้ำคร่ำ (amniocentesis) การเจาะเลือดทารกจากสายสะดือ (cordocentesis) หรือจาก DNA ของทารกในเลือดของหญิงตั้งครรภ์ (cell-free fetal DNA) จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด

สรุป

การตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ โดยเทคนิค multiplex fluorescent PCR เป็นวิธีทางเลือกที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ รวดเร็ว และราคาไม่แพง สามารถสนับสนุนการดำเนินงานควบคุมและป้องกันโรคกลุ่มอาการดาวน์ของประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงาน ขอขอบคุณ นพ. วีระยุทธ ประพันธ์พจน์ และคณะ จากสถาบันราชานุกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มอาการดาวน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

1. Wikipedia, the Free Encyclopedia. Down syndrome [Internet]. 2014 [cited 2014 Aug 15]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Down_syndrome
2. วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. กลุ่มอาการดาวน์ [อินเตอร์เน็ต]. 2557 [สืบค้นเมื่อ 15 ส.ค. 2557]. แหล่งข้อมูล: http://th.wikipedia.org/wiki/กลุ่มอาการดาวน์
3. สิริภากร แสงกิจพร, สมชาย แสงกิจพร. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อสนับสนุนการควบคุมและป้องกันโรคทางพันธุกรรม “โรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงและกลุ่มอาการดาวน์”. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข; 2548.
4. Spencer K, Cowans NJ, Avgidou K, Nicolaides KH. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of impending fetal death. Ultrasound Obstet Gynecol 2006;28:637-43.
5. Abele H, Lüthgens K, Hoopmann M, Kagan KO. Impact of the maternal age-related risk in first-trimester combined screening for trisomy 21. Fetal Diagn Ther 2011; 30(2): 135-40.
6. Kagan KO, Hoopmann M, Abele H, Alkier R, Lüthgens K. First-trimester combined screening for trisomy 21

with different combinations of placental growth factor, free β-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. Ultrasound Obstet Gynecol 2012;40:530-5.

7. Qi QW, Jiang YL, Zhou XY, Liu JT, Yin J, Bian XM. Genetic counseling, prenatal screening and diagnosis of Down syndrome in the second trimester in women of advanced maternal age: a prospective study. Chin Med J (Engl) 2013;126:2007-10.
8. Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. Hum Reprod Update 2004;10:541-8.
9. Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, et al. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes using fluorescence in situ hybridization (FISH). Am J Hum Genet 1992; 51:55-65.
10. สมชาย แสงกิจพร, บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค, ศศกรณ์ สารโสภณ, รัชนี ปรินายก, ประสพโชค เนียมรอด, อักษรา อภิลักษณชิต, และคณะ. การตรวจหาโครโมโซมแท่งที่ 21 ในเซลล์น้ำคร่ำที่ไม่ได้เพาะเลี้ยง โดยเทคนิคฟลูออเรสเซ็นต์ อินซิทู ไฮบริไดเซชั่น. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2543;42:20-7.
11. Fauzdar A, Chowdhry M, Makroo RN, Mishra M, Srivastava P, Tyagi R, et al. Rapid-prenatal diagnosis through fluorescence in situ hybridization for preventing aneuploidy related birth defects. Indian J Hum Genet 2013;19:32-42.
12. Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Hausler M, Sherlock J, Winter R, et al. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. Am J Obstet Gynecol 1997;177:899-906.
13. Findlay I, Toth T, Matthews P, Marton T, Quirke P, Papp Z. Rapid trisomy diagnosis (21, 18, and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. J Assist Reprod Genet 1998;15:266-75.
14. Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hackeloer BJ, Kerber S, Kochhan L, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. Mol Hum Reprod 2000;6:855-60
15. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Sciven PN, Docherty Z, et al. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. Lancet 2001; 358: 1057-61.
16. Bili C, Divane A, Apessos A, Konstantinos T, Apostolos A, Ioannis B, et al. Prenatal diagnosis of common aneuploidies using quantitative fluorescent PCR. Prenat Diagn 2002;22:360-5.
17. Quaife R, Wong LF, Tan SY, Chua WY, Lim SS, Hammersley CJN, et al. QF-PCR-based prenatal detection of aneuploidy in a Southeast Asian population. Prenat Diagn 2004;24:407-13.
18. Brown L, Arbigania M, Warburtong D, Brown S. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States. Prenat Diagn 2006;26:1068-74.
19. Rerkamnuaychoke B, Rinthachai T, Shotivaranon J, Jomsawat U, Siriboonpiputtana T, Chaiatchanarat K, et al. Thai population data on 15 tetrameric STR loci-D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818 and FGA. Forensic Sci Int 2006;158:234-7.
20. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. Prenat Diagn 2009;29:40-9.
21. Jain S, Panigrahi I, Gupta R, Phadke SR, Agarwal S. Multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction for detection of aneuploidies. Genet Test Mol Biomarkers 2012;16:624-7.
22. Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, et al. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. Eur J Hum Genet 1993;1:114-24.
23. Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, Ibanez MD, Lopez-Pajares I, Prieto F, et al. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. J Med Genet 1999;36:694-9.

24. Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek, B, Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. Ann Hum Genet 1998:62;9-23.

25. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. ตารางคู่มือบริการทางพยาธิ (อินเตอร์เน็ต). 2556 (สืบค้นเมื่อ 4 มิถุนายน 2557). แหล่งข้อมูล: http://med.mahidol.ac.th/patho/th/LabPatho/LabPatho_Human_Genetics

26. Blake D, Tan SL, Ao A. Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. Mol Hum Reprod 1999; 5:1166-75.

Abstract: Detection of Down Syndrome by Multiplex Fluorescent Polymerase Chain Reaction

Areerat Khorchai M.Sc.*; Budsaba Rerkamnuaychoke Ph.D.; Siripakorn Sangkitporn M.Sc.*; Sawitree Duangrueng B.Sc.*; Chonlada Yodtup B.Sc.*; Somchai Sangkitporn M.D., Ph.D.***; Angkana Herunsalee Ph.D.***

**Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; ** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital; ***National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health*

Journal of Health Science 2014;23:943-53.

Down syndrome is the most common chromosome abnormalities. In this study, the objective was to develop a method for detection of Down syndrome by using the multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR). The method was performed by amplification of STR markers located on chromosome 21 specific for loci D21S11, D21S1411 and D21S1413. The PCR products were analyzed based on the principle of capillary electrophoresis on an automated sequencer. Interpretation of the results could be performed by considering peak patterns in STRs. Normal samples showed two peaks with a peak area ratio of 1:1 or a single peak. Down syndrome samples were characterized by either three peaks, two peaks with a peak area ratio of 2:1 or a single peak. This method was performed in 32 DNA samples of Down syndrome patients and 50 DNA samples of normal subjects. All the results were in accordance with chromosome analysis. These data demonstrate that the technique is accurate, reliable and rapid for the detection of Down syndrome within 24 hours. This method should be useful to support the prevention and control program of Down syndrome.

Key words: **Down syndrome, multiplex fluorescent PCR, laboratory diagnosis**