



การประเมินประสิทธิภาพของวิธี Real-time PCR (TaqMan) ที่พัฒนาขึ้นใหม่สำหรับตรวจคัดกรองโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง ชนิดสไปนอล แบบการลบจีน SMN1 exon 7

ปริญญ์ ประสงค์ดี^{1*}, แพรวาลี วินทะไชย์¹, นพพร สวัสดิ์จ้อย¹, สุมาลัย เดชโยธิน¹,

กานดา ศรีกายสิทธิ์², กุณฑล วิชาจารย์²

¹ ศูนย์ความเป็นเลิศทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุลทางการแพทย์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์ความเป็นเลิศการแพทย์แม่นยำ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Evaluation of a Newly Developed Real-time PCR (TaqMan) Assay for Screening Spinal Muscular Atrophy exon 7 Deletion

Prinya Prasongdee^{1*}, Preawwalee Winatchai¹, Nopporn Sawatjui¹,

Sumalai Dechyotin¹, Kanda Sornkayasi², Khunton Wichajarn²

¹ Srinagarind Hospital Excellence Laboratory; SEL Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

² Center of Excellence Precision Medicine, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

หลักการและวัตถุประสงค์: โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงชนิดสไปนอล (SMA) เกิดจากการกลายพันธุ์ของจีน SMN1 โดยเฉพาะการขาดหายของ exon 7 การคัดกรองทารกแรกเกิดมีความสำคัญต่อการวินิจฉัย แต่ชุดตรวจเชิงพาณิชย์ เช่น Eonis™ SCID-SMA Kit มีราคาสูงสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด การศึกษานี้พัฒนาวิธี real-time PCR (TaqMan) ต้นทุนต่ำสำหรับตรวจหาการขาดหายของจีน SMN1 ใน exon 7 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์

วิธีการศึกษา: ตัวอย่างเลือดแห้ง (DBS) 41 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างควบคุม EQA-SMAPT 15 ตัวอย่าง (9 เป็น SMA, 6 ไม่เป็น SMA) และตัวอย่างคัดกรองทารกแรกเกิด 26 ตัวอย่าง (7 เป็น SMA, 19 ไม่เป็น SMA) วิเคราะห์ด้วยชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น (β -actin เป็นตัวควบคุมภายใน) และชุด Eonis™ (RPP30 เป็นตัวควบคุมภายใน) ด้วยหลักการ multiplex real-time PCR ความสอดคล้องประเมินด้วย Cohen's Kappa coefficient ความแตกต่างของ Ct วิเคราะห์ด้วย paired t-test ($p < 0.05$) และเปรียบเทียบต้นทุน

ผลการศึกษา: ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นสอดคล้องร้อยละ 100 กับ ชุดตรวจ Eonis™ (Cohen's Kappa = 1.0, $p < 0.001$) กลุ่ม SMA มี Ct > 40 บ่งชี้ถึงการขาดหายของจีน SMN1 ส่วนกลุ่มปกติมี Ct เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 23.57–25.56 และค่า SD อยู่ระหว่าง 0.39 – 2.07 บ่งชี้ถึงการมีอยู่ของจีน SMN1 โดย Paired t-test พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และพบว่าค่า Ct ของจีน β -actin และ จีน RPP30 ไม่ต่างกันแสดงถึงความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ต้นทุนของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น (150 บาทต่อการทดสอบ) ถูกกว่าชุดตรวจเชิงพาณิชย์ (500 บาทต่อการทดสอบ)

สรุป: ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพเทียบเท่าชุด Eonis™ แต่ต้นทุนต่ำกว่าสามเท่า เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด แนะนำให้ตรวจสอบในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่

คำสำคัญ: โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงชนิดสไปนอล, real-time PCR, ตัวอย่างเลือดแห้ง

*Corresponding author : Prinya Prasongdee, E-mail: pparin@kku.ac.th

Abstract

Background and Objective: Spinal muscular atrophy (SMA) is caused by SMN1 gene mutations, primarily exon 7 deletion. Newborn screening is deemed essential for early diagnosis, but commercial kits like the Eonis™ SCID-SMA Kit are considered costly for resource-limited settings. This study was designed to develop a cost-effective real-time PCR (TaqMan) assay for detecting SMN1 exon 7 deletion and compare its performance with the commercial kit.

Methods: Forty-one dried blood spot (DBS) samples, including 15 EQA-SMAPT quality control samples (9 SMA, 6 non-SMA) and 26 clinical newborn screening samples (7 SMA, 19 non-SMA), were analyzed. The developed assay (β -actin as internal control) and Eonis™ SCID-SMA Kit (RPP30 as internal control) were tested using multiplex real-time PCR. Diagnostic concordance was assessed with Cohen's Kappa coefficient, Cycle Threshold (Ct) differences with paired t-test ($p < 0.05$), and costs were compared.

Results: Complete concordance (100%) was observed between the developed assay and Eonis™ kit (Cohen's Kappa = 1.0, $p < 0.001$). Ct values > 40 were recorded in SMA samples, indicating SMN1 absence, while mean Ct values of 23.57–25.56 (SD = 0.39–2.07) were obtained in non-SMA samples, confirming SMN1 presence. Significant differences were detected ($p < 0.001$). No differences were found between β -actin and RPP30 Ct values. The developed assay's cost was 150 THB/test versus 500 THB for the commercial kit.

Conclusion: The developed assay's efficacy matches the Eonis™ kit at one-third the cost, ideal for resource-limited settings. Further validation with larger cohorts is recommended.

Keywords: spinal muscular atrophy, SMN1 exon 7 deletion, Real-time PCR, dried blood spot

บทนำ

โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงชนิดสไปนอล (spinal muscular atrophy: SMA) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดแบบจีนด้อย (autosomal recessive) ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์ประสาทสั่งการ (motor neurons) ในไขสันหลัง โดยมีสาเหตุหลักจากการกลายพันธุ์หรือการลบ (deletion) ของจีน SMN1 ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีน survival motor neuron (SMN) อันเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ประสาทสั่งการ การขาดโปรตีน SMN นำไปสู่การเสื่อมของเซลล์ anterior horn ในไขสันหลังทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงอย่างต่อเนื่องและรุนแรง อุบัติการณ์ของโรค SMA โดยเฉลี่ยพบในอัตราประมาณ 1 รายต่อทารกแรกเกิด 6,000–10,000 รายทั่วโลก และมีอัตราการเป็นพาหะประมาณ 1:40–1:60 ราย^{1,2} สำหรับในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ในอัตรา 1 ต่อ 5,102 ราย และมีพาหะในประชากรร้อยละ 2.8 หรือประมาณ 1:36 ราย³ แม้จะมีจีน SMN2 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ SMN1 มากกว่าร้อยละ 99 แต่เนื่องจากความแตกต่างที่ตำแหน่งเบสใน exon 7 ทำให้ SMN2 ผลิตโปรตีน SMN ที่สมบูรณ์ได้เพียงประมาณร้อยละ 10–15 เท่านั้น ผู้ป่วยที่มีจีน SMN2 หลายชุด (1–5 copies) อาจมีอาการของโรคที่รุนแรงต่างกัน โดยจำนวนสำเนาที่ยังมีมากมักสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคที่ลดลง⁴ ปัจจุบันการวินิจฉัยและการคัดกรองโรค SMA สามารถทำได้ตั้งแต่ก่อนตั้งครรภ์ผ่านการตรวจหาพาหะในพ่อแม่ หรือสามารถทำได้ในระยะทารกแรกเกิด (newborn screening) โดยตรวจหาความผิดปกติของจีน SMN1 ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในการวินิจฉัยโรคก่อนแสดงอาการ และเริ่มการรักษาได้อย่างรวดเร็ว เพื่อยับยั้งการเสื่อมของเซลล์ประสาท อย่างไรก็ตาม การตรวจหาจำนวนสำเนาของจีน SMN1 และ SMN2 มีความซับซ้อนเนื่องจากบริเวณนี้ของจีโนมมีความแปรผันสูงและมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันหลายตำแหน่ง ในปัจจุบันมีเทคนิคระดับโมเลกุลหลากหลายที่ใช้ในการวิเคราะห์จำนวนสำเนาของจีน ได้แก่ PCR ร่วมกับ capillary electrophoresis (PCR/CE)⁵, quantitative PCR (qPCR), digital droplet PCR (ddPCR)⁶, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)⁷ และ next-generation sequencing (NGS)⁸ ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน เช่น qPCR มีความรวดเร็ว ใช้งานง่าย แต่มีต้นทุนสูงจากการเตรียม standard curve ขณะที่ MLPA ให้ข้อมูลครอบคลุมทั้งจีน แต่ต้องใช้เวลาในการตรวจอย่างน้อย 24–48 ชั่วโมง PCR/CE ใช้เวลาน้อยกว่าแต่ตรวจได้เฉพาะบริเวณ exon

7 และ intron 7 ส่วน NGS ให้ข้อมูลที่ครอบคลุมที่สุด แต่มีความซับซ้อนและต้นทุนสูง⁹ สำหรับในประเทศไทยชุดตรวจเชิงพาณิชย์ เช่น Eonis™ SCID-SMA Kit (Revvity, USA) ซึ่งอาศัยหลักการ Real-time PCR แบบ TaqMan สามารถตรวจ exon 7 deletion ได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดด้านราคาและจำเป็นต้องตรวจตัวอย่างจำนวนมาก (96 ตัวอย่างต่อครั้ง) ทำให้ไม่เหมาะสมกับสถานพยาบาลที่มีปริมาณตัวอย่างน้อยหรือทรัพยากรจำกัด จากข้อจำกัดดังกล่าว ผู้ศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์ ดังนี้ 1) เพื่อพัฒนาวิธี Real-time PCR (TaqMan) ที่มีต้นทุนต่ำสำหรับการตรวจคัดกรองการขาดหายของจีน SMN1 exon 7 ในตัวอย่างเลือดแห้ง (dried blood spot: DBS) 2) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่กับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ Eonis™ SCID-SMA Kit ในแง่ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือ วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มุ่งหวังให้สามารถใช้งานได้กับตัวอย่างจำนวนน้อย มีความรวดเร็ว และเหมาะสมกับบริบทของห้องปฏิบัติการในประเทศไทย เพื่อสนับสนุนการคัดกรองทารกแรกเกิดอย่างมีประสิทธิภาพและทั่วถึง

วิธีการศึกษา

การออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ และไพรเมอร์ เฉพาะสำหรับตรวจการขาดหายของจีน SMN1 ใน exon 7 โดยใช้โปรแกรม Primer Quest™ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) และใช้จีน β -actin เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) โดยใช้ปริมาตรไพรเมอร์และไพรเมอร์เท่ากับ 0.3 ไมโครโมลต่อปฏิกิริยา

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างทั้งหมดเป็นเลือดแห้ง (dried blood spot: DBS) จำนวน 41 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2568 ถึงเดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2568 (3 เดือน) ซึ่งแบ่งเป็นสองกลุ่มได้แก่ 1) กลุ่มวัตถุประสงค์คุณภาพจากโปรแกรม EQA-SMAPT (Newborn Screening Quality Assurance Program: SMN1 Exon 7 Analysis to Detect Spinal Muscular Atrophy in DBS Proficiency Testing Program) จำนวน 15 ตัวอย่าง (ยืนยันเป็น SMA 9 ราย และไม่เป็น SMA 6 ราย โดยยืนยันการขาดหายหรือมีจีน SMN1 ใน exon 7) และ 2) ตัวอย่าง DBS คงเหลือจากการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด จำนวน 26 ตัวอย่าง (ผู้ป่วย SMA ที่วินิจฉัยแล้ว 7 ราย และทารกปกติ 19 ราย) ขนาดตัวอย่าง

คำนวณตามสูตร $n = (Z^2 \times p \times (1 - p)) / E^2$ โดยกำหนด $Z = 1.96$ สำหรับความเชื่อมั่น 95% โดยตัวอย่างทั้งหมดต้องมีคุณภาพ DNA เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ด้วย multiplex real-time PCR และตัวอย่างที่หลุดจากการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิดในการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่ HE661355) พร้อมเอกสารยินยอมจากผู้ปกครอง ทั้งนี้ ตัวอย่างที่ไม่ใช่เลือดแห้ง (DBS) หรือมีคุณภาพต่ำ เช่น DNA เสื่อมสภาพ ปนเปื้อน หรือมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการทำ PCR รวมถึงตัวอย่างที่ไม่มีผลยืนยันสถานะ SMA จากโปรแกรม EQA-SMAPT หรือจากการตรวจคัดกรองทารกแรกเกิด และตัวอย่างที่มีสารรบกวนการทำ PCR หรือ เก็บรักษาไม่เหมาะสม จะถูกคัดออกจากการศึกษา

การสกัดสารพันธุกรรมและการทดสอบ

สารพันธุกรรมถูกสกัดจากตัวอย่าง DBS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 มิลลิเมตร ด้วยชุดน้ำยา Elution Solution (Revvity, USA) จำนวน 160 ไมโครลิตร และเขย่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นตรวจด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR โดยใช้เครื่อง QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific, USA) ภายใต้ขั้นตอนปรับอุณหภูมิที่ 95 °C 10 นาที ตามด้วย 40 รอบที่ 95 °C 15 วินาที และ 60 °C 40 วินาที โดยใช้สารพันธุกรรมจำนวน 2 ไมโครลิตร ใน 1x Fast Start Essential DNA Probes Master (Roche, Switzerland) การประเมินเปรียบเทียบผลทำกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ Eonis™ SCID-SMA kit (Revvity, USA) ที่ใช้เครื่อง Real-Time PCR Thermal Cycler Eonis™ Q96

การเก็บข้อมูลและการแปลผล

ผลการทดสอบเป็นเชิงคุณภาพ โดยกำหนด Positive เมื่อไม่พบสัญญาณ (Ct) ของจีน SMN1 ใน exon 7 ขณะที่ internal control ปกติ และกำหนด Negative เมื่อพบสัญญาณ (Ct) ของจีน SMN1 ใน exon 7

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความสอดคล้องของผลระหว่างวิธีที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ประเมินด้วย Cohen's Kappa coefficient และเปรียบเทียบค่า Ct ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย SMA กับกลุ่มปกติด้วย paired t-test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ด้วยซอฟต์แวร์สถิติ SPSS version 26 IBM Corp., USA)

ผลการศึกษา

การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการขาดหายของจีน SMN1 ใน exon 7 โดยใช้เทคนิค Real-time PCR (TaqMan) ด้วยชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเอง (SMA exon7 qPCR Development) และเปรียบเทียบกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ Eonis™ SCID-SMA Kit โดยมีการออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะสำหรับจีน SMN1 และจีน β actin (ตารางที่ 1)

จากการทดสอบด้วยตัวอย่าง DBS จำนวน 41 ตัวอย่าง ครอบคลุมทั้งกลุ่มผู้ป่วย SMA, กลุ่มควบคุม EQA-SMAPT (positive และ negative) และกลุ่มคนปกติ พบว่า ผลการตรวจทั้งสองชุดน้ำยาให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 100 โดยสามารถตรวจพบจีน SMN1 ในกลุ่มที่ไม่เป็นโรค และตรวจไม่พบในกลุ่มผู้ป่วย SMA ทั้งสองวิธี โดยที่ชุดตรวจ Eonis™ ใช้จีน RPP30 และชุดที่พัฒนาขึ้นใช้ จีน β -actin เป็น housekeeping gene ผลการตรวจแสดงความสอดคล้องครบถ้วน (รูปที่ 1)

การวิเคราะห์ค่า Ct ของจีน SMN1 พบว่า กลุ่มผู้ป่วย SMA มีค่า Ct > 40 (ไม่พบสัญญาณ) ในทั้งสองชุดน้ำยา ขณะที่กลุ่มที่ไม่เป็นโรคมียา ค่า Ct เฉลี่ย (Mean) อยู่ระหว่าง 24.25 – 25.56 และ 23.57 – 24.58 ของชุดน้ำยา Eonis SCID-SMA kit และชุดน้ำยา SMA exon7 qPCR development ตามลำดับ แสดงถึงการตรวจพบจีน SMN1 อย่างชัดเจน ส่วนค่า Ct ของ housekeeping gene มีความเสถียรในทุกกลุ่มตัวอย่าง โดยพบค่า Ct เฉลี่ย (mean) อยู่ระหว่าง 24.82–26.36 และ 24.82 – 25.69 ของจีน RPP30 (Eonis™) และ จีน β -actin (SMA Exon7 qPCR Development) ตามลำดับ โดยมีค่า SD ของทั้ง 2 จีนอยู่ในระดับต่ำ (0.41–1.23) สะท้อนถึงความน่าเชื่อถือของปฏิกิริยา qPCR (ตารางที่ 2 และ 3)

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า Cohen's Kappa coefficient มีค่าเท่ากับ 1.0 ($p < 0.001$) แสดงถึงความสอดคล้องอย่างสมบูรณ์ (perfect agreement) ระหว่างชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ในการวินิจฉัยว่าเป็น SMA หรือไม่ นอกจากนี้การเปรียบเทียบค่า Ct ของจีน SMN1 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย SMA และกลุ่มที่ไม่เป็น SMA ด้วย paired t-test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ยืนยันความสามารถของวิธีที่พัฒนาขึ้นในการจำแนกผู้ป่วยและคนปกติได้อย่างชัดเจน

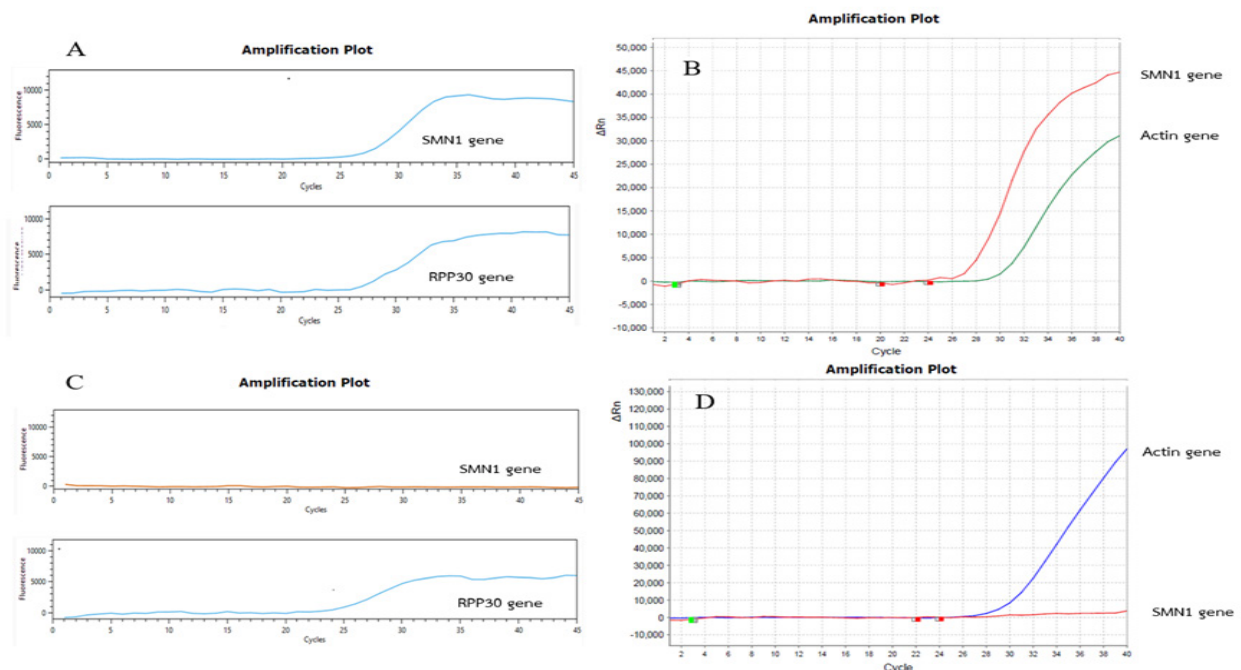
ผลการทดสอบจากปฏิกิริยา Real-time PCR assay (รูปที่ 2) ยืนยันว่า กลุ่มผู้ป่วย SMA ไม่พบค่า Ct ของจีน

SMN1 แต่ยังคงตรวจพบค่า Ct ของ housekeeping gene ขณะที่กลุ่มไม่เป็นโรคสามารถตรวจพบค่า Ct จิน SMN1 อย่างชัดเจน โดยค่า Ct ของจिनควบคุม (RPP30 และ β -actin) กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ยืนยันถึงความเสถียรของวิธีที่พัฒนาขึ้นและความสอดคล้องกับวิธีเชิง

พาณิชย์ นอกจากนี้เมื่อนำต้นทุนรวมของชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น โดยใช้ค่าวัสดุ ค่าวัสดุสนับสนุน ค่าเสื่อมครุภัณฑ์และอาคาร ค่าขบวนการเก็บส่งตรวจ และค่าบริหารจัดการ รวมเท่ากับ 150 บาทต่อการทดสอบ ซึ่งน้อยกว่าต้นทุนรวมของชุดตรวจเชิงพาณิชย์ ซึ่งเท่ากับ 500 บาทต่อการทดสอบ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับ DNA ของโพรบและไพรเมอร์ของ จิน SMN1 และจिन β -actin

โพรบและไพรเมอร์	ลำดับ DNA (5'---> 3')
SMN1 exon7 forward primer	GTGAAACAAAATGCTTTTAAACATCCA
SMN1 exon7 Reverse primer	CCATAAAGTTTTACAAAAGTAAGATTCACTT
SMN1 exon7 probe	FAM-ACAGGGTTTCAGACAAAATCAAAAAGA-TAMRA
β -actin forward primer	AGACCTACTGTGCACCTACT
β -actin Reverse primer	TTCTGGTGTGTCTCTCTGAC
β -actin Probe	Cy3-AGTGTTAGTACCTACACCCACA-BHQ



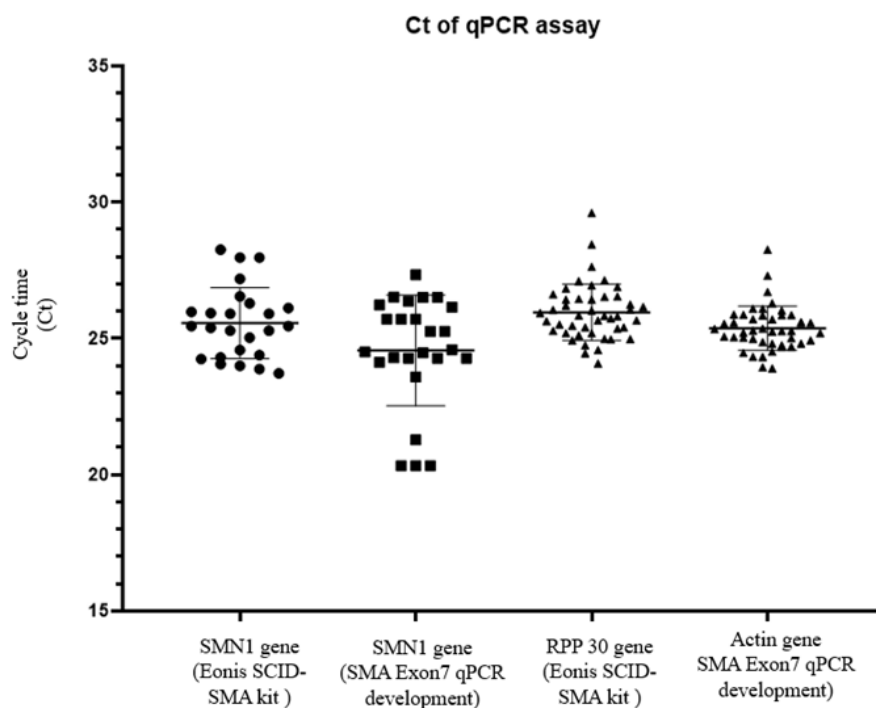
รูปที่ 1 ผลการตรวจโดยใช้ Eonis™ SCID-SMA Kit กับตัวอย่างของคนปกติ โดยตรวจพบจिन SMN1 และ จิน RPP30 (A) และ ผลการตรวจโดยใช้ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างของคนปกติ โดยตรวจพบ จิน SMN1 และ จิน β -actin (B) ผลการตรวจตัวอย่างของผู้ป่วย SMA โดยตรวจไม่พบจिन SMN1 และ ตรวจพบเฉพาะ จิน RPP30 (C) และผลการตรวจตัวอย่างของผู้ป่วย SMA โดยตรวจไม่พบจिन SMN1 และ ตรวจพบเฉพาะจिन β -actin (D)

ตารางที่ 2 ค่า Ct ของการตรวจวิเคราะห์ยีน SMN1 ในกลุ่มตัวอย่างโรค SMA และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค SMA ระหว่างชุดตรวจ Eonis™ SCID-SMA Kit และชุดตรวจ SMA exon7 qPCR development

ตัวอย่าง	จำนวน	Ct ของยีน SMN1 (Mean ± SD)	
		Eonis™ SCID-SMA Kit	SMA exon7 qPCR development
EQA-SMAPT เป็นโรค SMA	9	>45	>40
EQA-SMAPT ไม่เป็นโรค SMA	6	24.24 ± 0.39	23.57 ± 2.07
Sample เป็นโรค SMA	7	>45	>40
Sample ไม่เป็นโรค SMA	19	25.56 ± 1.30	24.56 ± 2.03

ตารางที่ 3 ค่า Ct ของการตรวจวิเคราะห์ Housekeeping gene ในกลุ่มตัวอย่างโรค SMA และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค SMA ระหว่างชุดตรวจ Eonis™ SCID-SMA Kit และชุดตรวจ SMA Exon7 qPCR Development

ตัวอย่าง	จำนวน	Ct ของยีน SMN1 (Mean ± SD)	
		Eonis™ SCID-SMA Kit (ยีน RPP 30)	SMA exon7 qPCR development (ยีน β -actin)
EQA-SMAPT เป็นโรค SMA	9	25.36 ± 0.89	24.82 ± 0.52
EQA-SMAPT ไม่เป็นโรค SMA	6	25.59 ± 0.74	25.15 ± 0.72
Sample เป็นโรค SMA	7	26.19 ± 0.41	25.28 ± 0.51
Sample ไม่เป็นโรค SMA	19	26.36 ± 1.23	25.69 ± 0.97



รูปที่ 2 แสดงการกระจายตัวของค่า Ct ในปฏิกิริยา qPCR การตรวจยีน SMN1, ยีน β -actin และ ยีน RPP30 ระหว่างชุดตรวจ Eonis™ SCID-SMA Kit และชุดตรวจ SMA exon7 qPCR Development

วิจารณ์

การทดสอบชุดน้ำยา SMA exon7 qPCR development ที่พัฒนาขึ้นแสดงความสอดคล้องกันร้อยละ 100 กับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ Eonis™ SCID-SMA Kit ในการตรวจจับการขาดหายของ exon 7 ในจีน SMN1 จากตัวอย่าง DBS จำนวน 41 ตัวอย่าง โดยมี Cohen's Kappa coefficient เท่ากับ 1.0 ($p < 0.001$) ซึ่งบ่งชี้ถึงความสอดคล้องอย่างสมบูรณ์กับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ Eonis™ SCID-SMA Kit และผล EQA-SMAPT รวมถึงผล paired t-test ที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรค SMA และไม่เป็นโรค SMA ซึ่งสามารถยืนยันความแม่นยำในการจำแนกสถานะทางพันธุกรรม การศึกษานี้มีจุดแข็งในด้านการออกแบบไพรเมอร์และโพรเบเฉพาะที่เหมาะสมกับบริบทประเทศไทย โดยสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนน้อยได้อย่างรวดเร็วและต้นทุนต่ำกว่าเมื่อเทียบกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์ แต่มีข้อจำกัดคือขนาดตัวอย่างค่อนข้างเล็ก ซึ่งอาจไม่ครอบคลุมความแปรผันทางพันธุกรรมที่หลากหลาย และไม่ได้รายงานค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยตรง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ เช่น การศึกษาของ Bouike และคณะ¹⁰ ที่ใช้ real-time PCR ตรวจ SMN2 ใน DBS ด้วยความแม่นยำสูงคล้ายกันแต่เน้น SMN2 deletion รวมถึงงานที่ใช้ digital PCR (ddPCR) ของ Kido และคณะ¹¹ ซึ่งให้ความแม่นยำสูงกว่า qPCR ในการนับ copy number แต่มีต้นทุนและความซับซ้อนมากกว่า การศึกษานี้จึงเป็นทางเลือกที่ประหยัด เพราะราคาต่อการทดสอบถูกกว่าชุดตรวจเชิงพาณิชย์ และสามารถใช้ในสถานพยาบาลที่มีเครื่อง real-time PCR ได้ แม้จะไม่ก้าวหน้าทางเทคนิคเท่ากับ NGS (Next Generation Sequencing) หรือ ddPCR ในงานอื่น ๆ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาการขาดหายของจีน SMN1 ใน exon 7 ได้อย่างมีประสิทธิภาพสอดคล้องกับรายงานของ Feldkötter และคณะ¹² และ Pyatt และคณะ¹³ ที่ยืนยันความแม่นยำของวิธี real-time PCR ในการตรวจจีน SMN1 deletion อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างที่น้อย และไม่ได้วิเคราะห์ copy number ของจีน SMN2 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความรุนแรงของโรค ดังนั้นแม้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นจะมีข้อได้เปรียบด้านต้นทุนต่ำ ความยืดหยุ่นสูง และเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด แต่ยังคงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่และการประเมินในระดับโครงการคัด

กรองทารกแรกเกิด เพื่อยืนยันศักยภาพในการนำไปใช้จริงในระบบบริการสุขภาพ

สรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจจีน SMN1 ใน exon 7 โดยใช้ Real-time PCR (TaqMan) ที่มีความไว ความจำเพาะ และความสอดคล้องกับชุดตรวจเชิงพาณิชย์สูงถึงร้อยละ 100 อีกทั้งจีนควบคุม (β -actin) ที่เลือกใช้มีค่า Ct ที่เสถียร สามารถยืนยันความน่าเชื่อถือของปฏิกิริยาได้ ผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าวิธีดังกล่าวมีศักยภาพในการนำไปปรับใช้จริงในห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยและคัดกรองโรค SMA ในทารกแรกเกิด

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการพัฒนาวิธี Real-time PCR (TaqMan) สำหรับตรวจคัดกรอง SMA exon 7 deletion แต่ควรขยายขนาดตัวอย่างให้ครอบคลุมความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรไทย พร้อมประเมินความไวและความจำเพาะของวิธี Real-time PCR (TaqMan) ที่พัฒนาขึ้นอย่างชัดเจน รวมถึงเพิ่มการวิเคราะห์จำนวนสำเนาจีน SMN2 เพื่อประเมินความรุนแรงของโรค SMA และทดสอบในบริบทการคัดกรองทารกแรกเกิดจริง เพื่อยืนยันศักยภาพในการนำไปใช้ในระบบบริการสุขภาพอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Phan HC, Taylor JL, Hannon H, Howell R. Newborn screening for spinal muscular atrophy: anticipating an imminent need. *Seminars in Perinatology* 2015;39(3):217-29. DOI: doi:10.1053/j.semperi.2015.03.006
2. Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 2002;111(6):477-500. doi:10.1007/s00439-002-0828-x
3. Chaisomchit S, Pho-iam T, Limwongse C, Likasitwattanukul S, Chareonsirawatana W, Yenchitsomanus P. Investigation of carrier frequency for spinal muscular atrophy (SMA) in Thailand using dried blood spot (DBS) specimens. *Genomics and Genetics* 2016;9(2):78-84.

4. Angilletta I, Ferrante R, Giansante R, Lombardi L, Babore A, Dell'Elice A, et al. Spinal Muscular Atrophy: An Evolving Scenario through New Perspectives in Diagnosis and Advances in Therapies. *Int J Mol Sci* 2023;24(19). doi:10.3390/ijms241914873
5. Qiao W, Ho C, Villanueva L, Hale C, Chen L, Liao L, et al. P540: Clinical implementation of carrier screening and diagnostic testing for spinal muscular atrophy using PCR/capillary electrophoresis assay. *Genetics in Medicine Open*. 2023;1(Suppl 1):100587. doi:10.1016/j.gimo.2023.100587
6. Park S, Lee H, Shin S, Lee ST, Lee KA, Choi JR. Analytical validation of the droplet digital PCR assay for diagnosis of spinal muscular atrophy. *Clinica Chimica Acta* 2020;510:787-9. doi:10.1016/j.cca.2020.09.024
7. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2006;16(12):830-8. doi:10.1016/j.nmd.2006.08.011
8. Zhao S, Wang Y, Xin X, Fang Z, Fan L, Peng Z, et al. Next generation sequencing is a highly reliable method to analyze exon 7 deletion of survival motor neuron 1 (SMN1) gene. *Scientific Reports* 2022;12(1):223. doi:10.1038/s41598-021-04325-1
9. Milligan JN, Blasco-Pérez L, Costa-Roger M, Codina-Solà M, Tizzano EF. Recommendations for Interpreting and Reporting Silent Carrier and Disease-Modifying Variants in SMA Testing Workflows. *Genes* 2022;13(9):1657. doi:10.3390/genes13091657
10. Bouike Y, Sakima M, Taninishi Y, Matsutani T, Noguchi Y, Bo R, et al. Real-time PCR-based screening for homozygous SMN2 deletion using residual dried blood spots. *Genes* 2023;14(12):2159. doi:10.3390/genes14122159
11. Kido J, Haruno K, Sugawara K, Anan K, Hattori Y, Noda Y, et al. Newborn screening for spinal muscular atrophy: the potential of digital polymerase chain reaction technique. *Mol Genet Metab* 2025;145(2):109114. doi:10.1016/j.ymgme.2025.109114
12. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70(2):358-68. doi:10.1086/338627
13. Pyatt RE, Prior TW. A feasibility study for the newborn screening of spinal muscular atrophy. *Genet Med* 2006;8(7):428-37. doi:10.1097/01.gim.0000227970.60450.b2

SMJ