นิพนธ์ต้นฉบับ . Original Article

การประเมินประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์โมเลกุลสารพันธุกรรมมะเร็งปอดจากเลือดชนิด Cell-Free Nucleic Acid ด้วยวิธี Next-Generation Sequencing

แพรววลี วินทะไชย, ปริญญา ประสงค์ดี, นพพร สวัสดิ์จุ้ย
ศูนย์ความเป็นเลิศทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุลทาง การแพทย์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Evaluation of the Analytical Performance of Next-Generation Sequencing in Detecting Lung Cancer Genetic Alterations from Cell-Free Nucleic Acid

Preawwalee Wintachai, Prinya Prasongdee, Nopporn Sawatjui
Srinagarind Hospital Excellence Laboratory; SEL, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

หลักการและวัตถุประสงค์: การตรวจการกลายพันธุ์มีบทบาทสำคัญในการประเมินโรคมะเร็ง การตรวจชิ้นเนื้อมะเร็งเป็นวิธีมาตรฐานที่รุกล้ำร่างกายโดยเฉพาะมะเร็งปอด การตรวจ cell-free DNA (cfDNA) จากเลือดเป็นวิธีที่ลดข้อจำกัดดังกล่าว การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์จาก cfDNAด้วย next-generation sequencing (NGS)

วิธีการศึกษา: ศึกษารูปแบบเชิงพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพเชิงวิเคราะห์ (Analytical validation study) ตัวอย่างประกอบด้วยสารมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ และตัวอย่างชีวภาพจากผู้ป่วย รวม 11 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ใน cfDNA จำนวน 11 ยีน ด้วยหลักการ NGS พร้อมประเมินการตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบความสอดคล้องผลการตรวจพบการกลายพันธุ์กับค่าอ้างอิง

ผลการศึกษา: ตรวจพบการกลายพันธุ์ในสารควบคุมระดับ 1% ได้ครบทุกตำแหน่ง (17/17 ตำแหน่ง; ร้อยละ 100) และระดับ 0.1% ได้ร้อยละ 75 (6/8 ตำแหน่ง) ตัวอย่างชีวภาพ 6 ตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับการตรวจ EGFR mutation ด้วย PCR ร้อยละ 100 และพบการกลายพันธุ์ร่วมในยีน TP53 และ BRAF ค่า %VAF ที่ได้มีความสอดคล้องกับค่าอ้างอิงระดับสูงมาก

สรุป: การตรวจ cfDNA ด้วยเทคโนโลยี NGS มีความถูกต้องและไวสูง ให้ผลการกลายพันธุ์สอดคล้องกับผลอ้างอิง และสามารถตรวจการกลายพันธุ์ระดับต่ำได้ถึง 0.1% VAF เหมาะสมสำหรับงานบริการทางคลินิกและการวิจัยด้านมะเร็ง

คำสำคัญ: ประสิทธิภาพเชิงวิเคราะห์, มะเร็งปอด, การตรวจมะเร็งแบบไม่รุกล้ำ, next-generation sequencing, cell-free nucleic acid

*Corresponding author: Preawwalee Winatchai, E-mail: preawi@kku.ac.th

Background and Objective: Mutation detection plays a crucial role in cancer assessment. Tumor tissue biopsy is the standard method but is invasive, especially for lung cancer. Testing cell-free DNA (cfDNA) from blood offers a less invasive alternative. This study aimed to evaluate a method for detecting mutations in cfDNA using next-generation sequencing (NGS).

Materials and Methods: This analytical validation study included 11 samples consisting of reference materials, external quality control samples, and clinical specimens. Mutation analysis was performed on 11 genes using NGS. The analytical performance was evaluated and compared with reference results.

Result: For reference samples and external quality assessment samples, mutations at a 1% variant allele frequency (VAF) level were detected in all targeted positions (17/17; 100%), and at a 0.1% VAF level in 75% of positions (6/8). All 6 clinical samples showed 100% concordance with EGFR mutation detection by PCR. Co-mutations in TP53 and BRAF genes were also identified in clinical samples. The detected %VAF values were strongly correlated with the expected references.

Conclusion: cfDNA testing using next-generation sequencing (NGS) demonstrates high accuracy and sensitivity, showing concordant mutation results with reference methods and the ability to detect low-level mutations down to 0.1% VAF. This method is suitable for clinical applications and cancer research.

Keyword: analytical performance, lung cancer, liquid biopsy, next-generation sequencing, cell-free nucleic acid

บทนำ

การตรวจวิเคราะห์ระดับสารพันธุกรรมด้วยเทคโนโลยีด้านจีโนมิกส์ เป็นวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่นำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการแพทย์แม่นยำ (precision medicine) ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์เพื่อหาการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม มีบทบาทสำคัญในการศึกษาพยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็ง[1] และมีส่วนช่วยในการวินิจฉัย คัดกรอง ติดตาม ทำนายผลการรักษา และสามารถใช้เพื่อพิจารณาทางเลือกการรักษาด้วยวิธีการใช้ยามุ่งเป้า (targeted therapy)[2] ซึ่งมีความสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งอย่างมาก โดยวิธีตรวจวินิจฉัยที่ใช้ในปัจจุบันและถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจหาการกลายพันธุ์ คือการตัดก้อนมะเร็ง (tissue biopsy) ไปตรวจโดยตรง[3] อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความซับซ้อน การจัดการตัวอย่างชิ้นเนื้อจำเป็นต้องมีผู้เชี่ยวชาญ และเป็นวิธีที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บรุกล้ำร่างกายผู้ป่วย (invasive technique) โดยเฉพาะในกรณีของผู้ป่วยมะเร็งปอด ซึ่งตำแหน่งของอวัยวะทำให้เก็บชิ้นเนื้อได้ยาก อีกทั้งผู้ป่วยมักจะเป็นผู้สูงอายุ[4] จึงมีความเสี่ยงมากในการได้รับการทำหัตถการจากแพทย์ ต่อมามีการพัฒนาเทคโนโลยีที่สามารถตรวจหาและวิเคราะห์มะเร็งจากเลือดของผู้ป่วยด้วย liquid biopsy โดยตรวจชิ้นส่วนสารพันธุกรรมจากก้อนมะเร็งที่อยู่ในกระแสเลือด หรือที่เรียกว่า cell-free DNA (cfDNA)[5] สามารถลดความเสี่ยงดังกล่าวลงได้ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่มีการรุกล้ำร่างกายผู้ป่วยหรือมีน้อยมาก สามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว ไม่ซับซ้อนและจัดการตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ได้โดยง่าย ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในกรณีที่ผู้ป่วยมีข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถเก็บชิ้นเนื้อก้อนมะเร็งได้ เช่น ผู้ป่วยที่มีระยะลุกลาม การตรวจติดตามความรุนแรงของโรคหรือติดตามการตอบสนองต่อการรักษาซึ่งมีความจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจซ้ำๆ นอกจากนี้การตรวจ cfDNA ไม่มีข้อจำกัดเรื่องของ heterogeneity ของก้อนมะเร็งอีกด้วย โดย cfDNA ในเลือดมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งรวบรวมการกลายพันธุ์ของมะเร็งที่อยู่ในตำแหน่งต่างๆ[6] ในขณะที่ตัวอย่างชิ้นเนื้อก้อนมะเร็งจะให้เฉพาะข้อมูลการกลายพันธุ์ของก้อนมะเร็งในบริเวณ biopsy เท่านั้น[7] อย่างไรก็ตามข้อจำกัดหลักของ liquid biopsy คือสารพันธุกรรมของก้อนมะเร็งที่อยู่ในกระแสเลือดมีปริมาณต่ำ การตรวจ cfDNA จำเป็นต้องใช้วิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์[8-10] ปัจจุบันศูนย์ความเป็นเลิศทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยระดับชีวโมเลกุลทางการแพทย์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ (srinagarind hos. excellence laboratory ; SEL) ได้เปิดให้บริการการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยหลักการ next-generation sequencing (NGS) เทคโนโลยี Ion GeneStudio S5 plus System platform ซึ่งมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ระดับ high throughput และ high sensitivity[11] เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ระดับเชิงลึก (deep sequencing) เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาการกลายพันธุ์ในตัวอย่าง cfDNA ดังนั้นการพัฒนาการตรวจการกลายพันธุ์ใน cell-free nucleic acid มาใช้ภายในห้องปฏิบัติการ ถือเป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจการกลายพันธุ์มีความสำคัญในการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งให้เริ่มได้รับการรักษาได้เร็ว และมีโอกาสที่ผลการรักษาจะมีประสิทธิภาพสูงตามไปด้วย ซึ่งจะช่วยให้ตรวจเจอรอยโรคได้เร็ว หรือก่อนมีอาการ หรือสำหรับการตรวจเพื่อเลือกวิธีการรักษา ติดตามยีนดื้อยาหลังได้รับด้วยยามุ่งเป้า การตรวจติดตามการกลับมาเป็นซ้ำของโรค หรือตรวจติดตามรอยโรคที่หลงเหลืออยู่ (minimal residual disease ;MRD)[12] ซึ่งมีการศึกษาพบว่าการตรวจด้วย cfDNA สามารถพบได้ไวกว่าการตรวจติดตามพื้นฐานถึง 2-3 เดือน[13] ดังนั้นศูนย์ SEL จึงได้ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคโนโลยี NGS ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมชนิด cfDNA จากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอด โดยใช้ชุดตรวจ oncomine lung cfTNA Assay ซึ่งครอบคลุมการกลายพันธุ์ชนิดสำคัญในทางคลินิก ได้แก่ single nucleotide variants (SNVs), insertion/deletion (Indels) และเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของ cfDNA ในพลาสม่าด้วยหลักการ NGS แบบ targeted-panel สู่งานทางด้านบริการและวิจัย ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมกับหน่วยงานมากขึ้น

วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

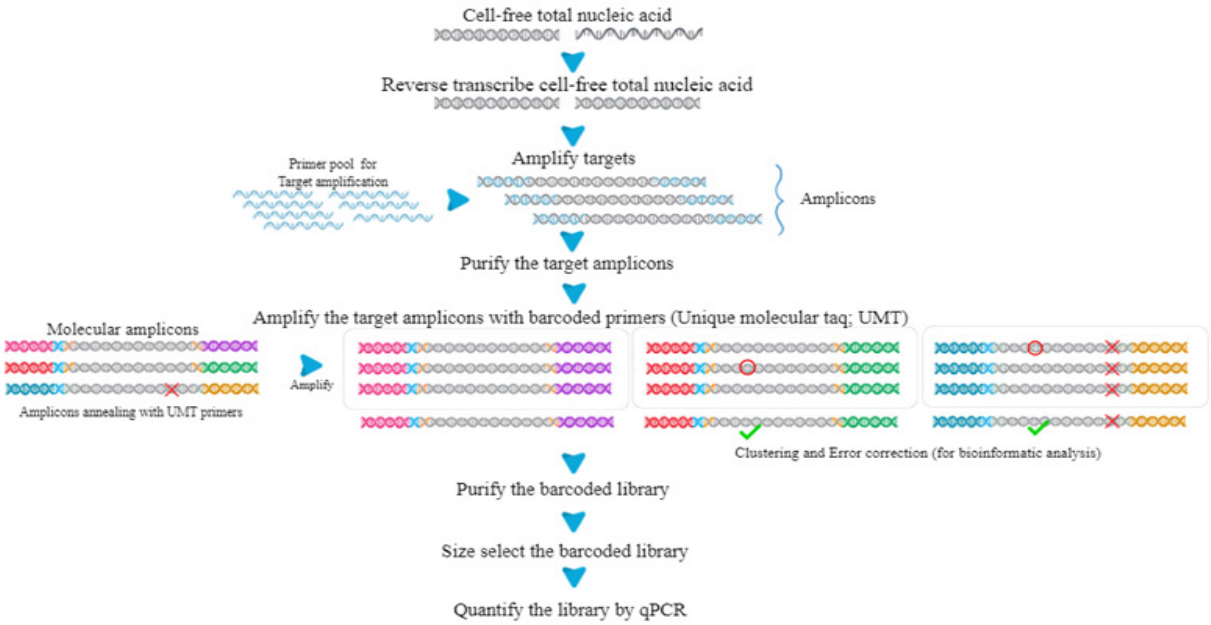
ชุดสกัด MagMAX Cell Free Total Nucleic Acid Isolation Kit (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) สำหรับสกัดสารพันธุกรรมจากพลาสม่า ประเมินคุณภาพความเข้มข้นของสารพันธุกรรมด้วย Qubit dsDNA HS Assay Kit (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และใช้น้ำยาตรวจวิเคราะห์ Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Research Assay (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศ

สหรัฐอเมริกา) เตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ (library preparation) โดยติด adapter barcode ชุด tag sequencing BC set 1-24 เพื่อระบุตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบมัลติเพล็กซ์ ประเมินคุณภาพความเข้มข้นของคลังดีเอ็นเอต้นแบบด้วย Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของสารพันธุกรรม (sequencing) ด้วยชุด Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef บนเครื่องตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสชุด Ion GeneStudio S5 Systems (Ion chef system และ Ion GeneStudio S5 Sequencer) (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ตัวอย่าง และวิธีทดสอบ

สารพันธุกรรมมาตรฐาน (standard) Horizon Discovery 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ชุด 0.1%, 1% Multiplex I cfDNA Reference Standard (มีการกลายพันธุ์ในยีน EGFR, KRAS, NRAS, PIK3CA ในระดับ 0.1% และ 1 %variant allele fraction; %VAF) และ 100% Multiplex I Wild Type cfDNA Reference Standard และตัวอย่างควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอกจากราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย (Thailand National External Quality Assessment Scheme for Precision Molecular Pathology; TNEQAS) ประจำปี พ.ศ. 2567 ชนิดพลาสม่า (blind samples) จำนวน 2 ตัวอย่าง และ สารพันธุกรรมจากเลือดชนิด cfDNA ที่ได้จากงานประจำซึ่งมีผลการตรวจ EGFR mutation จากพลาสม่าหรือชิ้นเนื้อ จำนวน 6 ตัวอย่าง (จริยธรรมเลขที่ HE681494)

สกัดสารพันธุกรรม cfDNA จากพลาสม่าทั้งสิ้น จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยชุดสกัด MagMax cfTNA isolation kit ตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างสารพันธุกรรมมาตรฐาน (n=3) และสารพันธุกรรมชีวภาพ (biological sample; n=8) รวมทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง ด้วย Qubit fluorometry และเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะลำดับเบสหลักการ NGS แบบ targeted-panel โดยการเตรียมคลังต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA library) (รูปที่ 1) วิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ targeted region บน cfDNA ทั้งสิ้น 11 ยีนได้แก่ ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS1 และ TP53 โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 58 regions ครอบคลุมการ กลายพันธุ์



รูปที่ 1 การเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library preparation) โดยเพิ่มจำนวนบริเวณตำแหน่งที่สนใจด้วยชุดไพรเมอร์ (primer pool) เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplicons) ติด barcoded primers ที่มีส่วนunique molecular tag (UMT) adapter เพื่อสร้าง molecular amplicons ที่มีการติดรหัสเฉพาะสำหรับแต่ละโมเลกุลและเพิ่มปริมาณ amplicon แต่ละกลุ่ม เพื่อติดตามข้อผิดพลาดของกระบวนการ PCR ก่อนอ่านลำดับเบสเพื่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ โดยจะได้ผลผลิต (product) สุดท้ายคือคลังดีเอ็นเอต้นแบบที่ประกอบไปด้วย ชิ้นส่วนดีเอ็นและบาร์โค้ดชนิด UMT ของแต่ละกลุ่มสำหรับขั้นตอนการอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

ชนิด single nucleotide variant (SNV) และ insertion/deletion (Indel) จำนวน 168 ตำแหน่ง hotspotsโดยการอ่านลำดับเบสด้วย Ion GeneStudio S5 Systems หลักการ semiconductor-based NGS วิเคราะห์ผลการอ่านลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างเพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับ human reference genome ผ่านโปรแกรม Torrent Suite (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และการแปลผลข้อมูลโดยใช้อัลกอริทึมทางชีวสารสนเทศได้แก่ Ion-Reporter (บริษัท Thermo Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ร่วมกับการแปลผลการกลายพันธุ์ตามแนวทางของ American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ปี ค.ศ. 2015 และ Association for Molecular Pathology (AMP) variant classification เปรียบเทียบผลการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบกับผลตรวจสารมาตรฐาน ผลการประเมินจากองค์กรภายนอก และผลการตรวจ EGFR mutation และวิเคราะห์ความสอดคล้องของค่าร้อยละของความถี่แอลลีลกลายพันธุ์ (%variant allele frequency; %VAF) ที่ตรวจพบในแต่ละตำแหน่งการกลายพันธุ์ กับค่าที่ทราบจากสารพันธุกรรมมาตรฐานและตัวอย่างควบคุม เพื่อประเมินความแม่นยำเชิงปริมาณของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้

ผลการศึกษา

ผลการเตรียมตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง ผ่านเกณฑ์การควบคุมคุณภาพ (quality value) ในขั้นตอนการสกัด cfDNA (cfDNA conc. ≥ 1 ng/µl) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.22 ±4.85 ng/µl และการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ (library conc. ≥ 100 pM) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 582.78 ±49.74 pM ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 100 การอ่านลำดับเบสด้วย Ion GeneStudio S5 System และวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ quality control & pre-processing ผ่านโปรแกรม Torrent suite ได้แก่ base calling มีคุณภาพผ่านเกณฑ์ Phred score ที่ Q20 ได้มากกว่าร้อยละ 95 จากทุกลำดับเบส สำหรับขั้นตอน alignment ลำดับเบสบน genome reference consortium human build 37 (GRCh37) ผลการวิเคราะห์ coverage analysis พบว่า median read coverage มากกว่า 20,000x โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 43,637x (± 17,366.62x) และ median molecular coverage มากกว่า 1,000x ในทุกตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2,928x (± 2082.14x) (ตารางที่ 1)

การวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ (variant calling) ด้วย Ion reporter พบว่าตัวอย่างที่ผลการกลายพันธุ์ที่พบในสารพันธุกรรมมาตรฐาน (n=3) พบว่า สารมาตรฐาน 0.1%VAF ตรวจพบการกลายพันธุ์ 6 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานที่ได้จากการตรวจหลัก

ตารางที่ 1 ผลการควบคุมคุณภาพของการเตรียมตัวอย่างสำหรับอ่านลำดับเบสและการวิเคราะห์การกลายพันธุ์

เลขที่ตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	คุณภาพการเตรียมLibrary ความเข้มข้น DNA Library (pM)	คุณภาพผลการอ่านลำดับเบส				คุณภาพการวิเคราะห์ Variant calling	
			ร้อยละเบสที่ได้ Phred score >Q20	Median Read Coverage (x)	Median Molecular Coverage (x)	%On-target (Functional read)	จำนวน Hotspot Variants ที่พบ	QC (LOD) %VAF
1	สารมาตรฐาน 0.1%VAF	3.00	96.37	23,228	1,932	95.24	6	0.154 - 0.297
2	สารมาตรฐาน 1%VAF	4.08	96.11	21,113	1,700	96.28	8	0.176 - 0.340
3	สารมาตรฐาน100% wild type	2.82	95.41	47,853	7,384	85.51	0	0.058 - 0.059
4	EQA1	12.1	95.21	36,889	4,766	91.23	9	0.062 -0.083
5	EQA2	15.3	96.83	18,065	2,886	85.60	0	0.10 - 0.12
6	ตัวอย่าง 1	1.70	95.32	36,064	1,961	96.50	0	0.15 - 0.19
7	ตัวอย่าง 2	1.06	97.21	65,882	2,926	96.86	3	0.10 - 0.12
8	ตัวอย่าง 3	2.00	95.44	58,567	5,355	95.96	2	0.06 - 0.07
9	ตัวอย่าง 4	1.66	97.21	61,696	1,700	97.70	2	0.18 - 0.21
10	ตัวอย่าง 5	1.40	96.41	55,792	1,137	97.57	0	0.26 - 0.33
11	ตัวอย่าง 6	1.27	95.92	54,859	463	97.96	0	0.65 - 0.88
	ค่าเฉลี่ย	4.22	96.13	43,637	2,928	94.22	-	-

*%VAF; ร้อยละความถี่ของอัลลีลกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ (variant allele frequency), LOD; ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (lower limit of detection)

การ digital PCR กำหนดไว้ 8 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 75 โดยผลการกลายพันธุ์ตรงกันจำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ SNV จำนวนทั้ง 6 ตำแหน่ง และไม่พบผลการกลายพันธุ์ชนิด Indel จำนวน 2 ตำแหน่ง สำหรับสารมาตรฐาน 1%VAF ตรวจพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานที่ได้จากการตรวจหลักการ digital PCR กำหนดไว้ 8 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 100 โดยผลการกลายพันธุ์ตรงกัน ได้แก่ SNV จำนวน 6 ตำแหน่ง และ Indel จำนวน 2 ตำแหน่ง สำหรับสารมาตรฐาน 100% wild type ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณ targeted region โดยมี limits of detection ที่ 0.0524 - 0.0533 %VAF (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของสารมาตรฐาน

ยีน	การกลายพันธุ์ที่พบและฟังก์ชั่น	Variant classification ACMG/AMP	สารมาตรฐาน 0.1%VAF			สารมาตรฐาน 1%VAF			สารมาตรฐาน 100% wild type		
			%VAF เป้าหมาย (dPCR)	%VAF ที่ตรวจพบ (NGS)	LOD (%)	%VAF เป้าหมาย (dPCR)	%VAF ที่ตรวจพบ (NGS)	LOD (%)	%VAF เป้าหมาย (dPCR)	%VAF ที่ตรวจพบ (NGS)	LOD (%)
EGFR	c.2573T>G p.Leu858Arg Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.15	0.22	1.00%	0.82	0.27	-	-	LOD ภาพรวมของการวิเคราะห์ผู้ป่วย: 0.052-0.053 %VAF
EGFR	c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del Gain	Pathogenic Tier1	-	-	-	1.00	0.73	0.10	-	-	
EGFR	c.2369C>T p.Thr790Met Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.13	0.20	1.00	0.79	0.26	-	-	
EGFR	c.2300_2308dup p.Ala767_Val769dup Gain	Pathogenic Tier1	-	-	-	1.00	0.68	0.34	-	-	
KRAS	c.35G>A p.Gly12Asp Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.06	0.09	1.00	1.30	0.11	-	-	
NRAS	c.181C>A p.Gln61Lys Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.37	0.16	1.00	1.05	0.19	-	-	
NRAS	c.175G>A p.Ala59Thr Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.21	0.16	1.00	1.11	0.19	-	-	
PIK3CA	c.1633G>A p.Glu545Lys Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.17	0.09	1.00	1.30	0.11	-	-	

*%VAF; ร้อยละความถี่ของอัลลีลกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ (variant allele frequency), LOD; ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (lower limit of detection), -; ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์

ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในตัวอย่างควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอกชนิด blind samples ตัวอย่างที่ 1 พบการกลายพันธุ์จำนวน 8 ตำแหน่ง บนยีน EGFR (6 ตำแหน่ง) KRAS (1 ตำแหน่ง) และ BRAF (1 ตำแหน่ง) และตัวอย่างที่ 2 ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจของสมาชิกห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ให้ผลตรงกันทั้ง 8 ตำแหน่งในตัวอย่างที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 100 และไม่พบการกลายพันธุ์ในตัวอย่างที่ 2 เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) ผลการตรวจวิเคราะห์ในกลุ่มสารพันธุกรรมชีวภาพ (known biological sample; n=6) ที่ทราบผลการตรวจวิเคราะห์ EGFR mutation ในพลาสม่าหรือชิ้นเนื้อ เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย Oncomine Lung cfTNA Research Assay หลักการ NGS พบว่าให้ผลตรวจการกลายพันธุ์ EGFR mutation ได้แก่ EGFR exon 19 Deletion, EGFR exon 20 p.T790M, EGFR Exon 21 p.L858R, EGFR exon 21 Insertion ตรงกันกับวิธี PCR จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยพบผลบวก 3 ตัวอย่าง และ ผลลบ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 นอกเหนือจากนี้ทั้ง 3 ตัวอย่างที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ EGFR ยังพบการกลายพันธุ์ที่ยีนอื่นร่วมด้วย ได้แก่ TP53 และ BRAF (ตารางที่ 4)

จากการตรวจการกลายพันธุ์ในตัวอย่างมาตรฐาน (reference standard) และตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในตัวอย่างควบคุมคุณภาพจากองค์กรภายนอกชนิด blind samples

ยีน	การกลายพันธุ์ที่พบและฟังก์ชั่น	Variant classification ACMG/AMP	EQA1			EQA2		
			%VAF เป้าหมาย (dPCR)	%VAF ที่ตรวจพบ (NGS)	LOD (%VAF)	%VAF เป้าหมาย (dPCR)	%VAF ที่ตรวจพบ (NGS)	LOD (%VAF)
EGFR	c.2240_2257del p.Leu747_Pro753delinsSer (Exon19Deletion) Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.64	0.06	0.00	-	Overall LOD of this simple analysis: 0.104 - 0.117
EGFR	c.2369C>T p.Thr790Met Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.72	0.07	0.00	-	
EGFR	c.2573T>G p.Leu858Arg Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.81	0.10	0.00	-	
EGFR	c.2303_2311dup p.Ser768_Asp770dup (Exon20Insertion) Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.95	0.07	0.00	-	
EGFR	c.2155G>A p.Gly719Ser Gain	Likely Pathogenic Tier1	0.86	0.77	0.07	0.00	-	
KRAS	c.34G>T p.Gly12Cys Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.82	0.06	0.00	-	
KRAS	c.38G>A p.Gly13Asp Gain	Pathogenic Tier1	1.01	1.01	0.06	0.00	-	
NRAS	c.181C>A p.Gln61Lys Gain	Pathogenic Tier1	1.00	1.13	0.09	0.00	-	
BRAF	c.1799T>A p.Val600Glu Gain	Pathogenic Tier1	1.00	0.88	0.08	0.00	-	

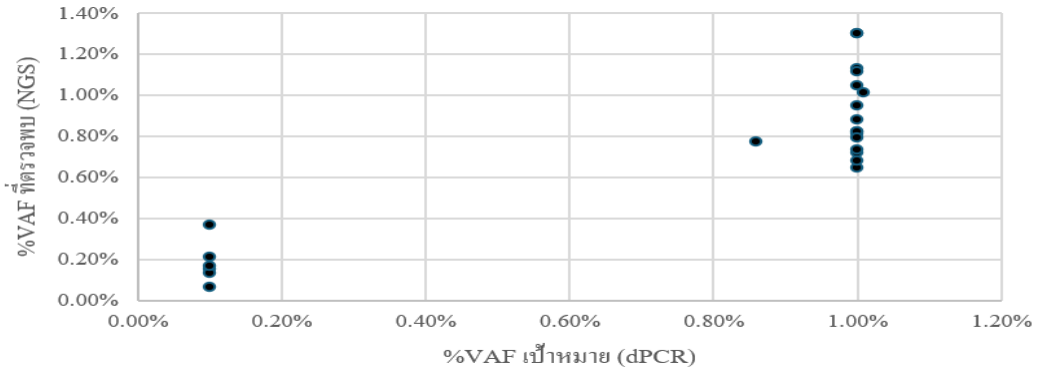
*%VAF; ร้อยละความถี่ของอัลลีลกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ (variant allele frequency), LOD; ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (lower limit of detection), -; ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์

จากองค์กรภายนอก พบว่าวิธีการตรวจนี้สามารถวิเคราะห์ %VAF มีค่าใกล้เคียงค่าที่มาตรฐานกำหนด โดยเมื่อเปรียบเทียบผล %VAF ที่ตรวจพบกับค่า %VAF ของวัตถุทดสอบที่กำหนดโดยหลักการ dPCR (5 ตัวอย่าง การกลายพันธุ์ทั้งสิ้น 23 ตำแหน่ง) ผลการวิเคราะห์ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.743$, t-test, SPSS) และพบว่า %VAF ของแต่ละการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบในทั้ง 2 หลักการมีค่าความสอดคล้องเชิงบวกระดับ strong positive correlation (Pearson coefficient : 0.893, $p < 0.001$, SPSS) ระดับ %VAF ของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ (รูปที่ 2)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในสารพันธุกรรมชีวภาพ (known biological sample) และผลการตรวจ EGFR mutation ในพลาสม่าหรือชิ้นเนื้อ

ชื่อตัวอย่าง	วิธี Oncomine Lung cfTNA Research Assay (NGS)					EGFR mutation (PCR)	
	ยีน	การกลายพันธุ์ที่พบและฟังก์ชัน	Variant classification ACMG/AMP	%VAF	LOD (%VAF)	ผลการตรวจ	ชนิดตัวอย่าง
ตัวอย่าง 1	Not detect pathogenic variant				0.15-0.19	No detected	plasma EGFR
ตัวอย่าง 2	EGFR	c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del (Exon19Deletion) Gain	Pathogenic Tier1	0.43	0.09	Exon 19 del/ Exon 20 p.T790M	FFPE Tissue Tumor content 10%
		c.2369C>T p.Thr790Met Gain	Pathogenic Tier1	0.10	0.09		
	TP53	c.743G>A p.Arg248Gln	Pathogenic Tier1	0.06	0.09	-	-
ตัวอย่าง 3	EGFR	c.2573T>G p.Leu858Arg Gain	Pathogenic Tier1	45.50	0.05	Exon 21 p.L858R	plasma EGFR
	BRAF	c.1799T>A p.Val600Glu Gain	Pathogenic Tier1	2.54	0.07	-	-
ตัวอย่าง 4	EGFR	c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del (Exon19Deletion) Gain	Pathogenic Tier1	6.63	0.15	Exon 19 del	FFPE Tissue Tumor content 30%
	TP53	c.743G>A p.Arg248Gln	Pathogenic Tier1	0.15	0.22	-	-
ตัวอย่าง 5	Not detect pathogenic variant				0.26-0.33	No detected	plasma EGFR
ตัวอย่าง 6	Not detect pathogenic variant				0.65-0.88	No detected	plasma EGFR

*%VAF; ร้อยละความถี่ของอัลลีลกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ (variant allele frequency), LOD; ขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (lower limit of detection), -; ไม่มีผลการตรวจการกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์, FFPE; ตัวอย่างชิ้นเนื้อชนิด formalin-fixed paraffin-embedded



รูปที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า %VAF ที่ตรวจพบกับค่าของวัตถุทดสอบที่มาตรฐานกำหนดโดยหลักการ dPCR

วิจารณ์

การตรวจ cfDNA ในผู้ป่วยมะเร็งปอด มีความสำคัญมาก เพราะช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยและดูแลรักษาโรคได้แม่นยำขึ้น โดยเฉพาะในด้านของการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนมะเร็งอย่างแม่นยำ ที่ไม่ต้องเจาะชิ้นเนื้อจากปอด (non-invasive method) ผลการวิเคราะห์การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค NGS โดยใช้ชุดตรวจ Oncomine Lung cfTNA Research Assay พบว่าการจัดตั้งระบบบริการสามารถควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ผ่านเกณฑ์ร้อยละ 100) โดยวิเคราะห์ลำดับเบสได้ผลลัพธ์คุณภาพสูง (Phred score > Q20 มากกว่าร้อยละ 95) และมีความลึกในการอ่านลำดับเบส (coverage) อยู่ในระดับสูง (median read coverage > 20,000x และ molecular coverage > 1,000x) ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในกลุ่ม reference standards แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำในระดับสูง โดยสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ครบทุกตำแหน่งในกลุ่ม 1% VAF (ร้อยละ 100) และบางส่วนในกลุ่ม 0.1% VAF (ร้อยละ 75) โดยไม่มีการตรวจพบการกลายพันธุ์ผิดพลาดในตัวอย่าง wild type (ร้อยละ 100) ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะ (specificity) ที่ดี อย่างไรก็ตามยังพบข้อจำกัดในการตรวจจับการกลายพันธุ์ชนิด Indel ที่ระดับ VAF 0.1% การเพิ่มจำนวน depth of sequencing หรือ median molecular coverage ให้มากกว่า 3,000X จะช่วยให้สามารถวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในระดับต่ำมาก (low-frequency variants) ได้ดีมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้อัลกอริทึม สำหรับการวิเคราะห์การกลายพันธุ์มีการประเมินช่วงค่า LOD ในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างเพื่อให้สามารถประเมินปริมาณ%VAF ต่ำสุดที่ “ตรวจพบ” ได้ในการตรวจวิเคราะห์นั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณภาพของสารพันธุกรรมตั้งต้นและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างรวมไปถึงการอ่านลำดับเบสในแต่ละรอบการวิเคราะห์ โดยการรายงานค่า LOD มีบทบาทสำคัญในการประเมินความไว ความแม่นยำ ความน่าเชื่อถือ และขีดจำกัดของการวินิจฉัย โดยเฉพาะเมื่อใช้ในการตรวจ cfDNA หรือการกลายพันธุ์ที่พบได้ในระดับต่ำ[14,15] ในการทดสอบกับตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (blind samples) และตัวอย่างชีวภาพจริง ผลที่ได้สอดคล้องกับวิธีอ้างอิงทั้งหมด (ร้อยละ 100) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าด้วยชุดตรวจเดียวกันของ Yong Gon Cho และคณะ[16] ยิ่งไปกว่านั้นสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนอื่นเพิ่มเติมในผู้ป่วยทั้ง 3 รายที่พบ EGFR mutation ได้แก่ การกลายพันธุ์ของยีน TP53 และ BRAF ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้จากวิธี PCR ที่ตรวจเฉพาะ EGFR เท่านั้น ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งในเชิงคลินิก เนื่องจากการกลายพันธุ์ของ TP53 อาจสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีหรือการดื้อยาบางชนิด[17,18] ขณะที่การกลายพันธุ์ของ BRAF เช่น V600E สามารถใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาด้วยยาเฉพาะทางได้ในปัจจุบัน[19] แม้ว่าการเปรียบเทียบค่าความถี่ของการกลายพันธุ์ (%VAF) กับค่ามาตรฐานจาก Digital PCR พบความสอดคล้องในระดับสูง ซึ่งแม้จะชี้ถึงแนวโน้มที่ถูกต้อง แต่ยังควรมีการประเมินเชิงสถิติอย่างละเอียดเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความแม่นยำขอวิธีการตรวจ และผลกระทบจากการเก็บและเตรียมตัวอย่างในเชิงปริมาณ โดยรวมแล้วแสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยี NGS ดังกล่าวมีศักยภาพในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนมะเร็งในตัวอย่าง cfDNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ แต่ยังมีช่องว่างที่ควรพัฒนาในแง่ของความไวในการตรวจ Indel และการวิเคราะห์เชิงปริมาณของ %VAF ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเก็บตัวอย่างพลาสม่าและการเตรียมตัวอย่างไปจนถึงการวิเคราะห์ลำดับเบส

สรุป

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมชนิด cfDNA โดยใช้ชุดตรวจ Oncomine Lung cfTNA Assay สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพในทุกขั้นตอนของกระบวนการ ตั้งแต่การสกัด การเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ การอ่านลำดับเบส จนถึงการวิเคราะห์ข้อมูล โดยผลการทดสอบตัวอย่างมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุมคุณภาพและตัวอย่างจริงมีความสอดคล้องกับค่าอ้างอิง โดยระดับการกลายพันธุ์ที่ 1% ครอบคลุมทุกตำแหน่ง ร้อยละ 100 (17/17 ตำแหน่ง) และ 0.1% ร้อยละ 75 (6/8 ตำแหน่ง) สำหรับตัวอย่างชีวภาพ 6 ตัวอย่าง พบว่ามีความสอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 ดังนั้นวิธีนี้สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ แม้ในระดับที่มีปริมาณ % VAF ต่ำถึง 0.1-1% ทั้งนี้แม้จะพบข้อจำกัดในประเด็นของความไวในการตรวจจับการกลายพันธุ์ชนิด Indel ที่ระดับ% VAF ต่ำมาก แต่โดยภาพรวมระบบสามารถรองรับการใช้งานทางคลินิกและวิจัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการศึกษาดังกล่าวเป็นแนวทางให้ศูนย์ SEL สามารถพัฒนาและเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของ cfDNA ด้วยเทคโนโลยี NGS ได้อย่างครอบคลุมทั้งกระบวนการ (workflow) ซึ่งสามารถรองรับงานด้านบริการทางคลินิกและงานวิจัยได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ ได้แก่ ขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ค่อนข้างน้อย (n = 11) ซึ่งยังไม่เพียงพอในการสรุปผลเชิงสถิติหรือยืนยันความแม่นยำในระดับประชากร

เอกสารอ้างอิง

1. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst 2005;97(5):339–46. doi:10.1093/jnci/dji055
2. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, et al. NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 2.2021. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN 2021;19(3):254–66. doi:10.6004/jnccn.2021.0013
3. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. Clin Cancer Res 2013;19(8):2240–7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246
4. Rischke N, Kanbach J, Haug U. Age differences in the treatment of lung cancer-a cohort study among 42,000 patients from Germany. J Cancer Res Clin Oncol 2024;150(11):503. doi:10.1007/s00432-024-06025-5.
5. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer 2017;17(4):223–38. doi:10.1038/nrc.2017.7
6. Ho HY, Chung KSK, Kan CM, Wong SCC. Liquid biopsy in the clinical management of cancers. Int J Mol Sci 2024;25(16):8594. doi:10.3390/ijms25168594.
7. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem 2015 ;61(1):112-23. doi: 10.1373/clinchem.2014.222679.
8. Pellini B, Szymanski J, Chin RI, Jones PA, Chaudhuri AA. Liquid biopsies using circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer. Thorac Surg Clin 2020;30(2):165–77. doi:10.1016/j.thorsurg.2020.01.005.
9. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. J Thorac Oncol 2018 ;13(9):1248–68. doi:10.1016/j.jtho.2018.05.030.
10. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2014;4:6269. doi:10.1038/srep06269
11. McNevin D, Watson J, Grisedale K, Dahal A, Goodwin C, Ward J. Comparison of commercial targeted amplicon sequencing assays for human remains identification casework. Int J Legal Med 2025;139(1):49–60. doi:10.1007/s00414-024-03364-9
12. Moding EJ, Nabet BY, Alizadeh AA, Diehn M. Detecting liquid remnants of solid tumors: circulating tumor DNA minimal residual disease. Cancer Discov 2021;11(12):2968–86. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0349
13. Jamshidi A, Liu MC, Klein EA, Venn O, Hubbell E, Beausang JF, et al. Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection. Cancer Cell 2022;40(12):1537–49. e12. doi:10.1016/j.ccell.2022.10.005
14. Yi H, Youk J, Lim Y, Roh H, Kyung D, Kim HP, et al. Analytical and clinical validation of a highly sensitive NGS-based ctDNA assay with real-world concordance in non-small cell lung cancer. Cancer Res Treat 2024;56(3):765–73. doi:10.4143/crt.2023.1321

15. Wu NJW, Aquilina M, Qian BZ, Loos R, Gonzalez-Garcia I, Santini CC, et al. The application of nanotechnology for quantification of circulating tumour DNA in liquid biopsies: a systematic review. IEEE Rev Biomed Eng 2023;16:499–513. doi:10.1109/RBME.2022.3183741

16. Cho YG, Park J, Han JY, Kim TY. Evaluation of the analytical performance of Oncomine Lung cfDNA Assay for detection of plasma EGFR mutations. Genes 2023;14(6):1219. doi:10.3390/genes14061219

17. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer 2019;19(9):495–509. doi:10.1038/s41568-019-0179-8

18. West HJ, McCleland M, Cappuzzo F, Reck M, Mok TS, Jotte RM, et al. Clinical efficacy of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in KRAS-mutated non-small cell lung cancer with STK11, KEAP1, or TP53 co-mutations: subgroup results from the phase III IMpower150 trial. J Immunother Cancer 2022;10(2):e003027. doi:10.1136/jitc-2021-003027

19. Bouchard N, Daaboul N. Lung cancer: targeted therapy in 2025. Curr Oncol 2025;32(3):146. doi:10.3390/curroncol32030146

SMJ