นิพนธ์ต้นฉบับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ STR บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ในประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับใช้วินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ด้วยวิธี QF-PCR

ณิชา คงพูลศิลป์[1], กัณหา มุยสุข[2], กุณฑล วิชาจารย์[3,4]

บทคัดย่อ

ความเป็นมา: Short tandem repeats (STR) เป็น microsatellites markers ที่มีความหลากหลาย นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรค Down syndrome (DS) ด้วยวิธี Quantitative fluorescent PCR (QF-PCR)

วัตถุประสงค์: คัดเลือก STR markers ที่เหมาะสมในการวินิจฉัย DS ด้วยวิธี QF-PCR สำหรับคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

วิธีการศึกษา: วิเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วย DS 26 ตัวอย่างด้วยวิธี QF-PCR เพื่อหา STR loci ที่ให้ผล informative มากที่สุด และวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือปกติ 191 ตัวอย่างด้วยวิธี QF-PCR เพื่อหา STR loci ที่มีความหลากหลายมากที่สุด

ผลการศึกษาและอภิปราย: จากการวิเคราะห์ ทั้งหมด 6 STR loci พบว่าตำแหน่งที่ให้ผล informative สูงสุดในตัวอย่าง DS 3 อันดับแรกได้แก่ D21S11 (92.3%), D21S1411 (84.6%), และ D21S1442(84.6%) ตามลำดับ STR loci ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผันสูงสุดได้แก่ D21S1444, D21S1437, และ D21S1411 เมื่อใช้ STR loci 3 ตำแหน่งที่ให้ผล informative มากที่สุดมาวินิจฉัย DS เปรียบเทียบกับ STR loci ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผันสูงสุด พบว่าสามารถวินิจฉัย DS ได้เท่ากันโดยมีความไว 96.1% แต่พบว่า D21S1437 และ D21S1444 มี allele ที่มีความถี่ในประชากรสูงถึง 33.3 และ 28.3% ตามลำดับ ดังนั้น STR loci ที่เหมาะสม 3 ลำดับแรกคือ D21S11, D21S1411, และ D21S1442

สรุป : D21S11, D21S1411, และ D21S1442 เป็น STR loci ที่เหมาะสมที่สุดในการวินิจฉัย DS ในกลุ่มประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

คำสำคัญ :

[1]สาขาวิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2]สาขาวิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[3]อนุสาขาเวชพันธุศาสตร์ สาขาวิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[4]ศูนย์ความเป็นเลิศการแพทย์แม่นยำ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

บทนำ

Short tandem repeats (STR) เป็น microsatellites markers ที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุด ๆ อยู่ต่อเนื่องกัน ส่วนใหญ่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 1-6 เบส ซ้ำกันประมาณ 5-25 ชุด พบกระจายอยู่ทั่วไปใน genome ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะ eukaryote[1] รวมถึงในมนุษย์ซึ่งพบได้ประมาณร้อยละ 3 ของทั้ง genome[2] STR ส่วนใหญ่อยู่ใน noncoding regions มีเพียงประมาณร้อยละ 8 ที่อยู่ใน coding regions[3] เนื่องจาก STR มีความหลากหลายที่แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล และยังเป็นชิ้นส่วน DNA fragments ที่มีขนาดเล็กทำให้สามารถเพิ่มจำนวนด้วยการทำ PCR ได้ง่าย จึงมีการนำ STR มาใช้อย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ เช่น การศึกษาทางด้านประชากรพันธุศาสตร์ การค้นหาตำแหน่งของยีนก่อนโรค การศึกษา genetic linkage analysis การพิสูจน์บุคคล การทดสอบทางนิติพันธุศาสตร์ นอกจากนี้ยังสามารถนำใช้ในการวินิจฉัยโรคได้อีกด้วย [8-10]

ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ STR ด้วยวิธี Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction (QF-PCR) เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคความผิดปกติของโครโมโซมในกลุ่ม aneuploidy เช่น Down syndrome; DS (trisomy 21), Edwards syndrome (trisomy 18) และ Patau syndrome (trisomy 13) เป็นต้น[11] โดยเฉพาะการนำไปใช้วินิจฉัย DS พบว่ามี sensitivity อยู่ระหว่างร้อยละ 95.4 – 100 และมี specificity สูงถึงร้อยละ 100[11-12] การวินิจฉัย DS โดยการตรวจวิเคราะห์ STR ด้วยวิธี QF-PCR มีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า และใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยสั้นกว่าการตรวจด้วยวิธี karyotyping analysis และ chromosome microarray ซึ่งเป็นการตรวจมาตรฐานทั้งจากการตรวจเลือด หรือจากการตรวจน้ำคร่ำที่ได้จาก amniocentesis[13-20] การตรวจวิเคราะห์ STR สำหรับวินิจฉัย DS ด้วยวิธี QF-PCR วิธีนี้ จำเป็นต้องใช้ STR markers อย่างน้อย 3 ตำแหน่งในการแปลผล[21] โดยถ้าพบลักษณะ triallelic patterns ที่มี allele peak ratio 1:1:1 หรือ diallelic patterns ที่มี allele peak ratio 2:1 จะสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็น Trisomy 21 แต่ถ้าใช้ STR marker เพียงตำแหน่งเดียวมีโอกาสสูงที่จะได้ผลเป็น homozygous หรือ non-informative pattern (single allele peak) ทำให้ไม่สามารถแปลผลได้ อย่างไรก็ดี STR markers บนโครโมโซมคู่ที่ 21 นั้นมีหลายตำแหน่งมาก และมี polymorphism ที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละกลุ่มประชากร ดังนั้นการเลือกใช้ STR markers ที่มีความหลากหลายสูงและเหมาะสมกับกลุ่มประชากรจึงทำให้ความแม่นยำในการวินิจฉัย DS สูงขึ้น ประชากรในแต่ละเชื้อชาติมี STR polymorphism ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้ STR markers ที่เหมาะสมจะใช้ในการวินิจฉัย DS ของแต่ละเชื้อชาติไม่เหมือนกันไปด้วย ตัวอย่างเช่น ในคนจีนเชื้อสายฮั่นพบว่ามี STR markers บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ที่เหมาะสมในการใช้วินิจฉัย DS ได้แก่ D21S1412, D21S1270, D21S11 และ D21S1442[22] ในคนเกาหลีพบว่า STR markers ที่เหมาะสมได้แก่ D21S11, D21S1411, D21S1270 และ D21S1412[12] ส่วนในคนอังกฤษพบว่า STR markers ที่ใช้เป็น D21S11, D21S1270, D21S1411, D21S266[23] เป็นต้น จะเห็นได้ว่า STR markers ที่เลือกใช้ในทั้ง 3 การศึกษานั้นแตกต่างกันออกไป การเลือก STR markers ที่เหมาะสมมาใช้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อที่จะเพิ่มโอกาสในการวินิจฉัยได้แม่นยำยิ่งขึ้น ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการศึกษา STR ที่เหมาะสมในการวินิจฉัย DS มีเพียงการศึกษาเดียวที่แสดงให้เห็นถึงการนำ STR markers มาใช้ในการตรวจหาความผิดปกติชนิด aneuploidy ใน preimplantation genetic diagnosis โดยทดลองใน blastomere จำนวน 30 เซลล์ ซึ่ง STR markers ที่ใช้ได้แก่ D13S258, D18S51 และ D21S1413 จะเห็นได้ว่ามี marker บนโครโมโซมคู่ที่ 21 เพียงอันเดียวเท่านั้น[24]

ดังนั้นข้อมูลเกี่ยวกับ polymorphism ของ STR markers บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ในประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจึงมีความสำคัญ และสามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการคัดเลือก STR markers ที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัย DS ด้วยวิธี QF-PCR ที่แม่นยำสำหรับคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในอนาคต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหารูปแบบ

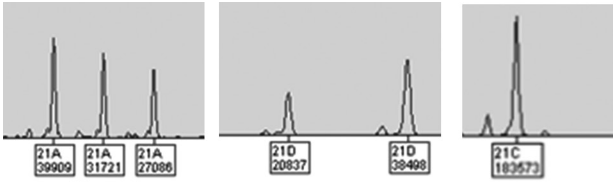
ความหลากหลายของ STR บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ในประชากรไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยกลุ่มอาการดาวน์ด้วยเทคนิค QF-PCR ในอนาคต

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า (prospective study) ซึ่งได้รับการรับรองจากศูนย์จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่โครงการ HE601112 การศึกษานี้ทำการตรวจวิเคราะห์ STR markers ของโครโมโซมคู่ที่ 21 ด้วยวิธี QF-PCR ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย DS ที่ได้รับการยืนยันการวินิจฉัยด้วยการตรวจ karyotyping analysis แล้วจำนวน 26 ตัวอย่าง เป็น positive control และตัวอย่างเลือดของคนปกติที่เหลือจากการเตรียมเลือดของผู้ที่มาบริจาคเลือดที่คลังเลือดกลาง รพ.ศรีนครินทร์ (leftover samples) จำนวน 191 ตัวอย่าง ตัวอย่างละประมาณ 3 - 4 ml ให้เป็น normal control

ตัวอย่างเลือดทั้ง positive control และ normal control จะถูกนำไปสกัด DNA ด้วย QIAamp® DNA micro kit (GIAGEN, Germany) และทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA โดยใช้ Devyser Compact V3 kit (Hagersten, Sweden) ซึ่ง STR markers บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มี 6 loci ดังนี้ D21S1435, D21S11, D21S1411 D21S1444, D21D1442, และ D21S1437 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดของแต่ละ STR markers ด้วยวิธี QF-PCR โดยใช้เครื่อง Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer และ GeneMapper® Software

ผล QF-PCR ในตัวอย่าง positive control จำนวน 26 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์เพื่อหา STR marker ที่ให้ informative result มากที่สุด การแปลผล QF-PCR ในกลุ่ม positive control จะให้ผลได้ 3 แบบ ได้แก่ triallelic, biallelic, และ monoallelic pattern โดย STR marker locus ที่ให้ผลเป็น triallelic pattern และ biallelic pattern จะแปลผลเป็น informative result โดย ratio ใน triallelic pattern จะต้องอยู่ระหว่าง 0.75-1.44 (peak distance <24) และ 0.75-1.54 (peak distance ≥24) และใน biallelic pattern ratio จะต้องมากกว่า 1.75 ส่วน monoallelic pattern จะแปลผลเป็น uninformative pattern ลักษณะผลแสดงดัง**รูปที่ 1** จากนั้นคำนวณหาสัดส่วนการให้ผลเป็น informative pattern ของทั้ง 6 STR loci ส่วนผล QF-PCR ในตัวอย่าง normal control จำนวน 191 ตัวอย่างจะถูกนำไปคำนวณหาความถี่ alleles ของ STR markers บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ในแต่ละ loci จากนั้นทำการคำนวณหา allele frequency ของแต่ละ STR markers เพื่อหา loci ที่มี polymorphism สูงที่สุด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากผล QF-PCR ในตัวอย่าง positive control และ normal control มาวิเคราะห์หา STR loci ที่ให้ผลแม่นยำที่สุด 3 ตำแหน่ง



A B C

รูปที่ 1 ผล QF-PCR ที่ให้ลักษณะ (A) triallelic, (B) biallelic (ratio 1:2) และ (C) monoallelic pattern ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย DS

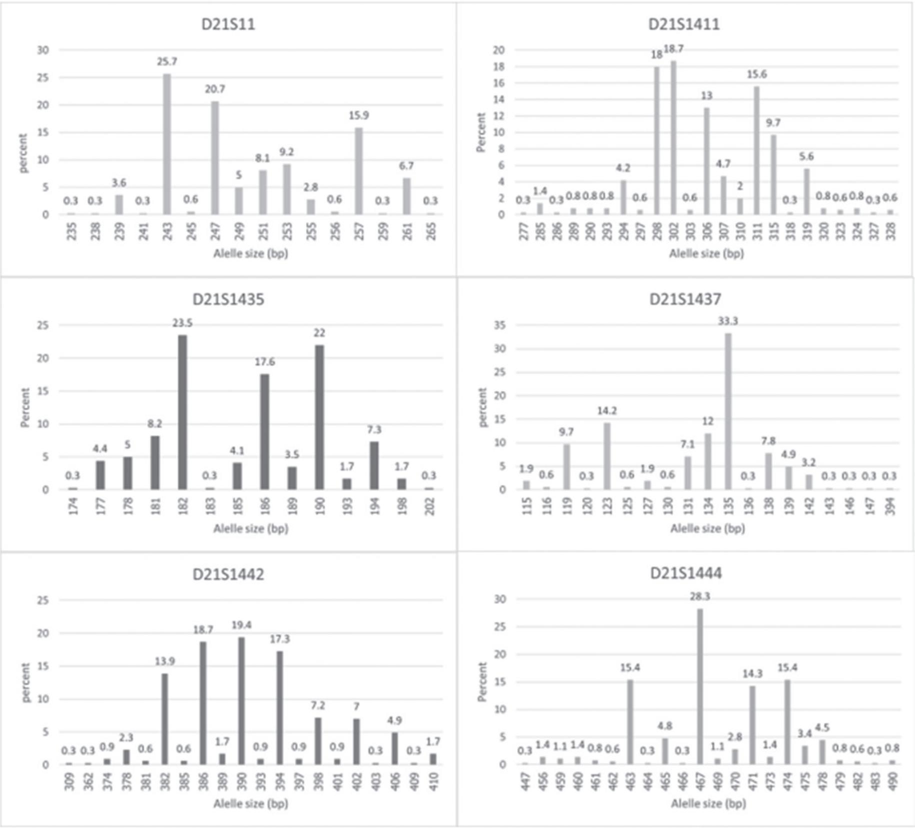
ผลการศึกษาวิจัย

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง positive control ของผู้ป่วย DS จำนวน 26 ตัวอย่าง ใน STR loci 6 ตำแหน่ง พบว่าแต่ละ STR loci ให้ผลที่เป็น informative (triallelic หรือ bilallelic pattern) และ uninformative (monoallelic pattern) แตกต่างกันออกไป โดยเรียงลำดับดังนี้ D21S11 (92.3%), D21S1411 (84.6%), D21S1442 (84.6%) , D21S1437 (76.9%), D21S1435 (65.4%), และ D21S1444 (65.4%) โดยมี 3 STR loci ที่ให้ผลในการวินิจฉัย DS ได้มากกว่า 80% ได้แก่ D21S11, D21S1411, และ D21S1442 ข้อมูล pattern ของ STR loci ดังแสดงใน**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่าง (%) ของผล QF-PCR ที่ให้ข้อมูลทั้ง informative และ uninformative ในแต่ละ STR loci บนโครโมโซมคู่ที่ 21 จำนวน 32 ตัวอย่าง

STR loci	D21S1435	D21S11	D21S1411	D21S1444	D21S1442	D21S1437
Informative	17(65.4%)	24(92.3%)	22(84.6%)	17(65.4%)	22(84.6%)	20(76.9%)
• Triallelic	9(52.9%)	12(50%)	11(50%)	7(41.2%)	10(45.4%)	3(15%)
• Bilallelic	8(47.1%)	12(50%)	11(50%)	10(58.8%)	12(54.6%)	17(85%)
Uninformative (monoallelic)	9(34.6%)	2(7.7%)	4(15.4%)	9(34.6%)	4(15.4%)	6(23.1%)

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด normal control ในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 191 ตัวอย่างด้วยวิธี QF-PCR โดยใช้ขนาด (bp) ของ STR markers ใน 6 loci บนโครโมโซมคู่ที่ 21 ในการจำแนก alleles พบว่าสามารถจำแนก alleles ในแต่ละ STR loci ตามจำนวน bp โดยเรียงลำดับได้ดังนี้ D21S1411 (23 alleles), D21S1444 (22 alleles), D21S1442 (20 alleles), D21S1437 (19 alleles), D21S11 (16 alleles), และ D21S1435 (14 alleles) ข้อมูลจำนวน การกระจายและความถี่ของ allele ในแต่ละ STR loci แสดงใน**รูปที่ 2** จากผลการศึกษาพบว่าตำแหน่ง STR loci ที่มีความถี่ของ allele มากที่สุดในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 อันดับแรกได้แก่ allele ขนาด 135 bp ของตำแหน่ง D21S1437 (33.3%), allele ขนาด 467 bp ของ D21S1444 (28.3%) และ allele ขนาด 243 bp ของ D21S11 (25.7%) ตามลำดับ พิสัยความถี่ของ alleles ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ค่าค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (coefficient of variation; CV) และค่าความแปรปรวน (variance) ของทั้ง 6 STR loci แสดงใน**ตารางที่ 2** โดยพบว่า STR loci ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผันสูงที่สุด 3 ลำดับแรกคือ D21S1444, D21S1437, และ D21S1411 ตามลำดับ



รูปที่ 2 แสดงจำนวน การกระจาย และความถี่ของ allele ในแต่ละ STR loci ของตัวอย่าง normal control จำนวน 191 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายของข้อมูล และค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (CV) ในแต่ละ STR loci ของตัวอย่าง normal control จำนวน 191 ตัวอย่าง

STR loci	D21S1435	D21S11	D21S1411	D21S1444	D21S1442	D21S1437
จำนวน alleles	14	16	23	22	20	19
พิสัยของความถี่ (Range)	79	91	66	100	66	102
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	8	7.97	6.12	7.23	6.72	8.1
ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (CV)	112	127	140	159	134	153
ค่าความแปรปรวน (Variance)	64	63.5	37.5	52.3	45.2	65.6

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาใน positive control จำนวน 26 ตัวอย่างพบว่า STR loci ที่สามารถให้ข้อมูลที่เป็น informative data มากที่สุด (สามารถใช้วินิจฉัย DS ได้) 3 อันดับแรกคือ D21S11 (92.3%), D21S1411 (84.6%), และ D21S1442 (84.6%) ตามลำดับ และผลจากการวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่าง normal control จำนวน 191 ตัวอย่าง พบว่า STR loci ที่มีจำนวน allele มากที่สุด 3 อันดับแรกคือ D21S1411 (23 alleles), D21S1444 (22 alleles), D21S1442 (20 alleles) ตามลำดับ และ STR loci ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรผัน (CV) มากที่สุด 3 อันดับแรกคือ D21S1444 (159), D21S1437(153) และ D21S1411(140) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ข้อมูลพบว่า STR loci D21S1411 อยู่ใน 3 ลำดับแรกของทั้ง 3 การวิเคราะห์ ถึงแม้ว่าตำแหน่งที่ให้ informative data มากที่สุด 3 อันดับแรกจะมีเพียง D21S1411 ที่มีจำนวน allele สูงที่สุด และมีค่า CV ที่สูงเป็นลำดับต้น ๆ แต่ทั้งสามตำแหน่งมี allele frequency ที่ใกล้เคียงกันในแต่ละขนาด และส่วนใหญ่ <25% ทุก bp ตำแหน่ง STR loci ที่มี allele frequency มากที่สุดในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ allele ขนาด 135 bp ของตำแหน่ง D21S1437 (33.3%), allele ขนาด 467 bp ของ D21S1444 (28.3%) และ allele ขนาด 243 bp ของ D21S11 (25.7%) ซึ่งมีโอกาสที่จะให้ข้อมูล uninformative ได้มากเนื่องจากพบได้บ่อยในประชากร ถึงแม้ว่า D21S1444 และ D21S1437 จะมีค่า CV ที่ค่อนข้างสูงก็ตาม แต่อาจจะไม่เหมาะในการใช้วินิจฉัย DS ในกลุ่มประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

เมื่อเปรียบเทียบ STR loci ทั้ง 6 ตำแหน่งในการศึกษานี้กับการศึกษาในกลุ่มประชากรเชื้อชาติอื่นดังแสดงใน**ตารางที่ 3** พบว่า การใช้ D21S11, D21S1411, และ D21S1442 ที่ให้ผล informative สูงที่สุด 3 อันดับแรกในการวินิจฉัย DS ในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มี sensitivity สูงถึง 96.1% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาในประเทศอื่น และเมื่อนำ STR loci ที่มีค่า CV สูงที่สุด 3 ลำดับแรก (D21S1411, D21S1444, และ D21S1437) มาใช้ในการวินิจฉัย DS พบว่า sensitivity 96.1% เท่ากับการใช้ STR loci ที่มีค่า informative สูงสุด (D21S11, D21S1411, และ D21S1442) แม้ว่าทั้ง 2 ชุด STR loci จะให้ sensitivity เท่ากัน แต่จะพบว่า D21S1444 และ D21S1437 มี allele ที่มี allele frequency สูงมากในประชากรมีโอกาสเสี่ยงได้ข้อมูลเป็น uninformative มากกว่า ดังนั้นหากพิจารณา STR loci เพียง 3 ตำแหน่ง ผู้นิพนธ์จึงคิดว่า STR loci ตำแหน่ง D21S11, D21S1411, และ D21S1442 จะเหมาะสมที่สุด

ข้อมูลจากการศึกษานี้ยังคงสนับสนุนว่าการวินิจฉัย DS โดยใช้ STR loci เพียง 3 ตำแหน่งสามารถให้การวินิจฉัย DS ได้เป็นส่วนใหญ่ แต่ยังมีโอกาสที่จะให้ผลเป็น uninformative ทั้ง 3 ตำแหน่งได้ประมาณ 3.9% ทำให้ต้องไปทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีอื่นเช่น karyotype analysis ดังนั้นการวินิจฉัย DS ไม่ว่าจะเป็น prenatal หรือ postnatal diagnosis โดยใช้ STR loci เพียง 3 ตำแหน่งที่คัดเลือกมาซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนค่าใช้จ่ายลดลงนั้น อาจจะยังไม่เหมาะสมเนื่องจากยังมีโอกาสที่ให้การวินิจฉัยไม่ได้อีกประมาณ 3.9% แต่อาจมีประโยชน์ในการนำไปใช้วินิจฉัยผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะวิกฤตซึ่งต้องการได้ผลการวินิจฉัยอย่างรวดเร็วเร่งด่วนเพื่อนำไปใช้ตัดสินใจวางแผนการรักษาที่เหมาะสม หรือเพื่อตัดสินใจว่าจะยุติการรักษาหรือไม่

เนื่องเทคนิคนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งรวดเร็วกว่า และมีต้นทุนที่ถูกกว่าการตรวจด้วยเทคนิคอื่น เช่น karyotype analysis หรือ FISH หากได้ผล uninformative จึงค่อยส่งตรวจด้วยเทคนิคอื่นต่อไป อีกปัจจัยสำคัญคือ กลุ่มตัวอย่างที่เป็น positive control ในการศึกษานี้มีเพียง 26 ตัวอย่าง อาจทำให้ไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนได้ ดังนั้นการศึกษาในประชากรขนาดใหญ่มากกว่านี้จะให้ข้อมูลที่แม่นยำมากขึ้น หรือ การศึกษาตำแหน่ง STR loci อื่นนอกเหนือจาก 6 ตำแหน่งในการศึกษานี้ อาจจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือก STR loci ที่เหมาะสมมากขึ้น จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าแต่ละประเทศมีการใช้ STR คนละตำแหน่ง แม้ว่าประเทศเดียวกันเช่น ประเทศจีนซึ่งมีประชากรที่หลากหลายเชื้อชาติ ก็จำเป็นต้องเลือก STR ที่เหมาะสมกับกลุ่มประชากรเพื่อจะได้วินิจฉัยได้แม่นยำถูกต้อง

สรุปผลการศึกษา

การใช้ STR loci เพียง 3 ตำแหน่ง (D21S11, D21S1411, และ D21S1442) ในการวินิจฉัย DS มีความไวสูง แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้เป็นการตรวจเพื่อยืนยันการวินิจฉัย DS ได้ ควรใช้ STR loci มากขึ้น หรือทำการศึกษา STR loci ตำแหน่งอื่นเพิ่มเติมที่มีความหลากหลายที่สุดในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้มีข้อจำกัดเนื่องจาก STR loci ที่นำมาวิเคราะห์ในการศึกษานี้ได้มาจาก Devyser commercial kit ซึ่งวิเคราะห์ STR loci markers บน chromosome คู่ที่ 21 เพียง 6 ตำแหน่งเท่านั้น ซึ่งอาจจะไม่ใช่ STR loci ที่มีความหลากหลายสูงที่สุดในประชากรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และมี

ตารางที่ 3 แสดง STR ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์เพื่อวินิจฉัย DS ด้วยเทคนิค QF-PCR ในแต่ละกลุ่มประชากร

	Lee MH., et al. 2004 Korea [12]	Mackic-Durovic M., et al. 2014 Bosnia and Herzegovina [13]	Guan L., et al. 2013 China [15]	Shi Y., et al. 2012 China [16]	Jain S., et al. 2010 USA [18]	Yang L., el al. 2004 China [20]	Zhu YN., et al. 2015 China [22]	Khorchai A., et al. 2014 Thailand [25]	Kongpulsilp N., et al. 2022 Thailand [This study]
Sensitivity	95.4%	97.2%	-	100%	86.7%	95.4%	-	100%	
Specificity	100%	-	-	97.39%	-	-	-	-	
D21S1435		√							√
D21S1437									√
D21S11	√	√		√	√	√	√	√	√
D21S1270	√	√					√		
D21S1411	√	√				√		√	√
D21S226		√							
D21S2055					√				
D21S1412			√				√		
D21S1442							√		√
D21S2039			√						
D21S1440				√					
D21S1413								√	
D21S1444									√

การเลือกใช้ STR เพียง 3 ตำแหน่งในการวินิจฉัย DS เนื่องจากปัญหาค่าใช้จ่าย ถ้าหากวิเคราะห์ตำแหน่งอื่น ๆ เพิ่มขึ้นจะได้ตำแหน่งที่มีความเหมาะสมในการวินิจฉัย DS ที่จำเพาะกับกลุ่มประชากรมากที่สุด การนำเทคนิคนี้ไปใช้แทนการตรวจ karyotype ในอนาคตควรมีการศึกษาความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Res. 2000,10:967-81.
2. Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2007;5:7-14.
3. Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. Nat. Genet. 2000;24:400–2.
4. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409(6822):860-921.
5. Huang Q.Y. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. Am J Hum Genet. 2002;70:625-34.
6. Kayser M. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. Am J Hum Genet. 2000;66(5):1580-8.
7. Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(3):1041-6.
8. Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature. 1994;368(6470):455-7.
9. Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. Am J Hum Genet. 1994;55:175-89.
10. Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature. 1996;380:152-4.
11. Muthuswamy S, Agarwal S. Segmental Duplication QF-PCR: A Simple and Alternative Method of Rapid Aneuploidy Testing for Developing Country Like India. J Clin Lab Anal. 2017;31:e22038.
12. Lee MH, Ryu HM, Kim DJ, et al. Rapid prenatal diagnosis of Down Syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. J Korean Med Sci. 2004;19: 341-4.
13. Mackic-Durovic M, Projic P, Ibrulj S, Cakar J, Marjanovic D. A comparative analysis of the effectiveness of cytogenetic and molecular genetic methods in the detection of Down syndrome. Bosn J Basic Med Sci. 2014;14:94-8.
14. Svecova I, BurjanivovA T, Krsiakova J, et al. Rapid detection of the most common chromosomal aneuploidies in the second-trimester amniotic fluid using QF-PCR. Ceska Gynekol. 2013;78:373-8.
15. Guan L, Ren C, Li H, Gao L, Jia N, Guan H. Practicality of rapid prenatal screening for Down syndrome with PCR-short tandem repeat method. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2013;30:277-82.
16. Shi YF, Li XZ, Li Y, Zhang XL, Zhang Y, Yue TF. Diagnosis of Down's syndrome using short tandem repeat loci D21S11, D21S1440 and Penta D. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2012;29:443-6.
17. Kriventsova NV, Shokarev RA, Avrutskaia VV, et al. Use of quantitative fluorescence polymerase chain reaction in the invasive prenatal diagnosis of Down's syndrome. Klin Lab Diagn. 2010;:27-30.
18. Jain S, Agarwal S, Panigrahi I, Tamhankar P, Phadke S. Diagnosis of Down syndrome and detection of origin of nondisjunction by short tandem repeat analysis. Genet Test Mol Biomarkers. 2010;14:489-91.

19. Liou JD, Chu DC, Cheng PJ, et al. Human chromosome 21-specific DNA markers are useful in prenatal detection of Down syndrome. Ann Clin Lab Sci. 2004;34:319-23.
20. Yang LL, Ou YH, Xu XM. Rapid molecular diagnosis of trisomy 21 using the PCR-STR-SSCP technique. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2004;21:466-9.
21. Tóth T, Findlay I, Papp C, et al. Pre-natal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. J Med Genet. 1998;35:126-9.
22. Zhu YN, Lu SM, Wang M, Shen FX, Chen Y, Hu JJ. Genetic analysis of STR markers on chromosome 21 in a Han population from southeast China. Genet Mol Res. 2015;14:1718-25.
23. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, 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(9287):1057-61.
24. Wongkularb A, Rerkamnuaychoke B, Weerakiet S, Navephap S, Campiranon A. Genetic Diagnosis of Sex and Trisomies 13, 18, 21 in Human Single Cell Embryo by Multiplex Fluorescent Polymerase Chain Reaction. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 2005;39:440-5.
25. Khorchai A, Rerkamnuaychoke B, Sangkitporn S, et al. Detection of Down Syndrome by Multiplex Fluorescent Polymerase Chain Reaction. Journal of Health Science. 2014;23(5),943-53.

Genetic polymorphism of STR loci on chromosome 21 in Northeastern Thai people for diagnosis of Down syndrome by QF-PCR

Nicha Kongpulsilp[1], Kanha Muisuk[2], Khunton Wichajarn[3,4]

[1]Departments of Pediatric, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

[2]Departments of Forensic Medicine, Faculty of Medicine

[3]Division of Medical Genetics, Departments of Pediatric, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

[4]Center of Excellent in Precision Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

** Corresponding author: Nicha Kongpulsilp, E-mail: Nichko@kku.ac.th*

Background: Short tandem repeats (STR) are highly polymorphic microsatellites markers and widely used for making a diagnosis of Down syndrome (DS) by Quantitative fluorescent PCR (QF-PCR).

Objective: to determine the most appropriate STR markers for making a diagnosis of DS with QF-PCR in northeastern Thai people.

Material and method: The authors analyzed 26 blood samples of DS patients by QF-PCR and determined the most informative results. Blood samples from 191 normal northeastern Thai people were also analyzed to document the highest polymorphism.

Result and discussion: Among 6 STR loci, the top 3 informative STR loci were D21S11 (92.3%), D21S1411 (84.6%), and D21S1442(84.6%), respectively. The STR loci with highest coefficient of variation (CV) were D21S1444, D21S1437, and D21S1411, respectively. The top 3 informative STR loci can make a diagnosis of DS with a sensitivity of 96.1% that equal to the top 3 STR loci with highest CV. But D21S1437 and D21S1444 loci had allele with highest frequency 33.3 and 28.3%, respectively. So, the most appropriate STR loci are D21S11, D21S1411, and D21S1442.

Conclusion: The D21S11, D21S1411, and D21S1442 are the most appropriate STR loci for making a diagnosis of DS in Northeastern Thai people.

Keywords: Short tandem repeats (STR), QF-PCR (Quantitative fluorescent PCR), Down syndrome