



ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่และการประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย

Fetal DNA in maternal plasma and its application to non-invasive prenatal diagnosis of thalassemia

สุพรรณ พูเจริญ, วารุณี ตั้งวิวัฒน์

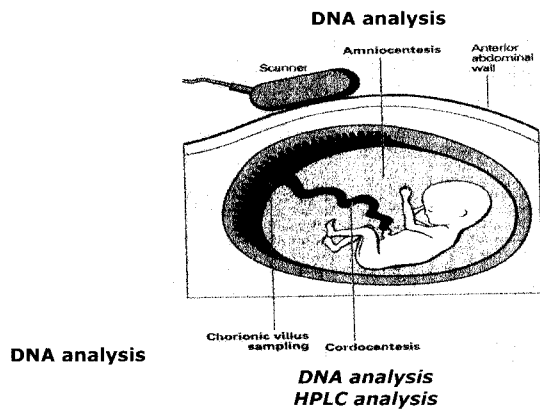
บทนำ

ธาลัสซีเมียโรคโลหิตจางกรรมพันธุ์ที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีผู้ที่เป็นพาหะสูงถึงร้อยละ 30-40 ของประชากร จึงมีอัตราเสี่ยงของคู่สมรสที่จะมีโอกาสมีลูกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงสูง แนวทางการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ดำเนินการในประเทศไทยขณะนี้ ดำเนินการพร้อมกันทั้งสองแนวทาง คือ การให้การรักษาคู่ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่เป็นอยู่แล้วให้ดีที่สุดกับการป้องกันไม่ให้มีผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเกิดขึ้นมาใหม่ เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาซึ่งต้องสูญเสียงบประมาณเป็นจำนวนมาก การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยง จึงเป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งของการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงของประเทศไทย ซึ่งโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ถูกกำหนดไว้มี 3 โรค คือ โรคทารกบวมน้ำฮีมोगิลบินบาร์ทิส (Hb Bart's hydrops fetalis), โรคโฮโมไซกัสธาลัสซีเมีย (Homozygous β -thalassemia) และโรคเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีมोगิลบินอี (β -thalassemia / Hb E)^(1,2)

โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมียที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบันในหลายหน่วยงานทำได้โดยการนำเอาเซลล์หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอของทารกในครรภ์ที่ได้จากการเจาะน้ำคร่ำ (amniocentesis), เจาะชิ้นเนื้อรก (chorionic villus sampling) หรือ การเจาะเลือดจาก

สายสะดือของทารกในครรภ์ (fetal blood sampling) มาเป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (รูปที่ 1) โดยการเจาะชิ้นเนื้อรกสามารถทำได้ระหว่างอายุครรภ์ ประมาณ 10-12 สัปดาห์ การเจาะน้ำคร่ำนิยมทำในช่วง 16-20 สัปดาห์ ส่วนการเจาะเลือดจากสายสะดือทารกทำได้ผลดีเมื่ออายุครรภ์มากกว่า 18 สัปดาห์ขึ้นไป การเจาะเก็บตัวอย่างจากทารกในครรภ์จึงขึ้นอยู่กับอายุครรภ์และความชำนาญของสูติแพทย์เป็นหลัก⁽³⁾ และใช้เป็นหลักในการให้บริการได้ผลดีในหลายแห่งจนถึงปัจจุบัน⁽⁴⁻⁶⁾ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจแบบ invasive จะมีความปลอดภัยใช้แพร่หลายมากขึ้น แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนหลังหัตถการ เช่น น้ำคร่ำรั่ว, การติดเชื้อ, การแท้งบุตร และคลอดก่อนกำหนด เป็นต้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายทั้งต่อมารดาและทารกในครรภ์ ความวิตกกังวลของมารดาที่จะเกิดขึ้นในภายหลัง ต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ยังยากซับซ้อน ตลอดจนปัญหาการปนเปื้อนของแม่ในตัวอย่างทารก เป็นต้น จึงได้มีความพยายามศึกษาหาแนวทางการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ไม่กระทบต่อทารกโดยตรงแบบ non-invasive ขึ้นการพยายามแยกเอาเซลล์ของทารก (fetal cell) หรือ ดีเอ็นเอทารก (cell free fetal DNA) ในกระแสเลือดแม่มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยจึงได้รับการศึกษาวิจัยกันมากในปัจจุบัน

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างจากทารกในครรภ์เพื่อการวินิจฉัยในแบบ invasive ประกอบด้วย การเจาะเนื้อรก การเจาะน้ำคร่ำ และการเจาะเลือดจากสายสะดือ

การศึกษาเซลล์ทารกในเลือดแม่

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีในการแยกเซลล์ ทำให้สามารถเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของทารก (fetal erythroblast) ซึ่งปนเปื้อนในกระแสเลือดของแม่ได้ ชนิดของเซลล์ทารกในครรภ์ที่ปะปนอยู่ในเลือดแม่ซึ่งมีทั้งชนิด trophoblast, เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) และเม็ดเลือดแดง (fetal nucleated red blood cells) อย่างไรก็ดี เนื่องจากจำนวนเซลล์ทารกในเลือดแม่มีอยู่จำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ของแม่ โดยมีอยู่เพียงประมาณ 1 ใน 10^5 ถึง 10^6 ของเซลล์แม่เท่านั้น และขึ้นอยู่กับอายุครรภ์^(7, 8) ทำให้วิธีการแยกเซลล์ทารกให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก ราคาแพง การตรวจวิเคราะห์เซลล์เดี่ยวที่แยกได้ (single cell analysis) ทำได้ยาก และต้องการเทคโนโลยีขั้นสูงและเป็นอุปสรรคสำคัญในการประยุกต์ใช้ในงานประจำวัน นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบเซลล์ของทารกในเลือดแม่ได้ภายหลังจากคลอดแล้วเป็นระยะเวลาจนถึง 5 ปี ทำให้มีผลต่อการตรวจวินิจฉัยสำหรับการตั้งครรภ์ครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างที่สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้หลายโรครวมทั้งโรคธาลัสซีเมียด้วย^(9,10)

การตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์

ในปี ค.ศ. 1997 Lo YMD และคณะ ได้รายงานการตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่เป็นครั้งแรก และเป็นการแสดงให้เห็นถึงแนวทางการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แบบ non-invasive เนื่องจากหากสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ได้ ก็ไม่จำเป็นต้องเจาะเก็บตัวอย่างทารกโดยวิธี invasive ที่มีความเสี่ยง⁽¹¹⁾ นอกจากนี้มีหลักฐานบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้อย่างอิสระ (free form หรือ cell free DNA) ทั้งในผู้ป่วยและในคนปกติ แต่ยังไม่มีความชัดเจนแสดงถึงแหล่งที่มาของดีเอ็นเอเหล่านี้ มีเพียงข้อสันนิษฐานว่าอาจมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte หรือ เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (nucleated red cells) อื่นๆ และมีรายงานพบว่าผู้ป่วยมะเร็งมีปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมาสูงกว่าคนปกติหลายเท่า และเชื่อกันว่าจะมาจากการแตกสลายของ nucleated blood cells หรือ tumor cells ทำให้เกิดการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา หรืออาจเกิดจากกลไก apoptosis⁽¹²⁾ และกลไกอื่นที่มากกระตุ้นการเกิด Tumor necrosis และปริมาณดีเอ็นเอที่พบ จะพบในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อมีการลุกลามของโรคมะเร็ง และเมื่อทำการรักษาด้วยการฉายรังสี พบว่าระดับดีเอ็นเอในพลาสมาลดลงสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรค สามารถใช้ติดตามผลการรักษาและบ่งบอกถึงการลุกลามของโรคในผู้ป่วยมะเร็งได้⁽¹³⁾ สำหรับแหล่งที่มาของดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่นั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามาจากแหล่งใด แต่เชื่อว่าส่วนหนึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไก apoptosis ของ fetal nucleated cell ในกระแสเลือดแม่⁽¹⁴⁾ แต่เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่มีปริมาณสูงมากกว่าจำนวน fetal cell หลายเท่า จึงน่าจะมีกลไกอื่นเกี่ยวข้องด้วย เช่น การปลดปล่อยดีเอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อทารกโดยตรงผ่านทาง feto-maternal interface เป็นผลให้สามารถตรวจ

พบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ได้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง กล่าวคือ โดยเฉลี่ยพบได้ถึงร้อยละ 3.4 (range 0.39 - 11.9%) และร้อยละ 6.2 (range 2.3 - 11.4%) ของ ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากพลาสมาแม่ขณะ ตั้งครรภ์ในระยะแรกๆและในระยะหลังตามลำดับ^(15, 16) ข้อมูลสำคัญอย่างหนึ่งที่เป็นผลให้มีการนำเอาเทคนิค การตรวจดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ไปใช้อย่างกว้างขวาง คือ การที่ดีเอ็นเอทารกจะเริ่มถูกกำจัดออกจากเลือดแม่ อย่างรวดเร็วภายหลังคลอดเพียงไม่กี่นาทียและตรวจไม่ พบเลยภายหลังคลอดแล้ว 2 ชั่วโมง ไม่ว่าก่อนคลอด จะพบปริมาณดีเอ็นเอสูงมากเพียงใดก็ตาม โดยมีค่า half life เฉลี่ยอยู่ที่ 16.3 นาที (range 3-40 นาที)⁽¹⁷⁾ ทำให้การตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาขณะตั้งครรภ์ แต่ละครั้งไม่ไปรบกวนต่อการใช้ในการวินิจฉัยสำหรับการ ตั้งครรภ์ครั้งต่อไป กลไกในการกำจัดดีเอ็นเอของทารก จากเลือดแม่ดังกล่าวคาดว่าจะอาจมีความเกี่ยวข้องกับไต โดยมีรายงานการศึกษาของ Botezatu และคณะ⁽¹⁸⁾ ที่ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอทารกที่จำเพาะกับ Y chromosome ในปัสสาวะหญิงตั้งครรภ์ได้ เชื่อว่าการตรวจพบดีเอ็นเอ ทารกในปัสสาวะหญิงตั้งครรภ์เป็นสิ่งบ่งชี้ว่า ไต น่าจะเป็น อวัยวะที่มีความเกี่ยวข้องกับการกำจัดดีเอ็นเอทารก ออกจากกระแสเลือดแม่

สำหรับการนำมาใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ นั้น Lo และคณะ เป็นกลุ่มแรกที่ตรวจพบดีเอ็นเอทารก ในพลาสมาและซีรัมของหญิงตั้งครรภ์ในปี ค.ศ. 1997⁽¹¹⁾ โดยใช้ผลการตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะกับโครโมโซม Y (sex-determining region Y: SRY) จากพลาสมา และซีรัมแม่ที่มีทารกในครรภ์เป็นเพศชายเป็นตัวบ่งชี้ และตรวจไม่พบในหญิงตั้งครรภ์ที่มีทารกเป็นเพศหญิง การตรวจขณะนั้นใช้วิธีง่ายๆ โดยนำพลาสมาและซีรัม ไปต้มที่ 99°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ จากพลาสมาและซีรัมที่สกัดได้ เพียง 10 ไมโครลิตร ในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ก็สามารถให้ผลการตรวจได้อย่าง ถูกต้องและสามารถใช้ในการบอกเพศทารกได้ นับจากนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจให้ดีขึ้นและมีความไว มากขึ้นอย่างแพร่หลาย เช่น การตรวจด้วยเทคนิค Real-

time quantitative PCR⁽¹⁹⁾ หรือ การตรวจด้วยยีน ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ SRY เป็นต้น^(20, 21) นอกจากนี้ เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมาและซีรัมทำได้ง่ายขึ้น โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปทำให้เพิ่มความไวในการตรวจทำนาย เพศทารกได้สูงถึงร้อยละ 100 ในบางรายงาน การศึกษา เพิ่มเติมของ Lo และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่าสามารถตรวจ พบดีเอ็นเอของทารกได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ของการตั้งครรภ์ และพบในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่ออายุครรภ์มากขึ้น การตรวจ ดีเอ็นเอที่จำเพาะกับทารกเพศชายในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ นำไปสู่การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อ การเกิดโรคที่มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์แบบ X-linked recessive หรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการ ถ่ายทอดยีนผิดปกติมาจากบิดา เช่น Rh factor⁽²²⁾, myotonic dystrophy⁽²³⁾ และ Congenital adrenal hyperplasia⁽²⁴⁾ เป็นต้น ต่อมาการศึกษาพบว่าปริมาณ ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์จะมีปริมาณสูงขึ้นมาก กว่าปกติในรายที่มีความผิดปกติต่างๆของการตั้งครรภ์⁽²⁵⁾

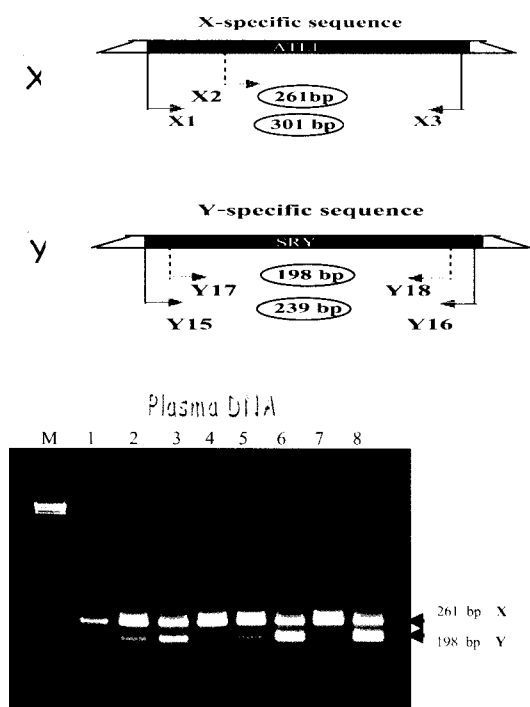
การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทารกในพลาสมา แม่กับการวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย

ในปี ค.ศ. 2002 กลุ่มวิจัยของ Lo และคณะ⁽²⁶⁾ เป็นกลุ่มแรกที่ได้รายงานว่า สามารถให้การตรวจวินิจฉัย ทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมียที่เป็นชนิด Homozygous β -thalassemia ได้อย่างถูกต้อง โดยการตรวจยีนธาลัส ซีเมียของทารกชนิด $\beta^{41/42}$ mutation (-TCTT) ที่ได้รับ การถ่ายทอดมาจากพ่อในพลาสมาของแม่ซึ่งเป็นพาหะ β -thalassemia ชนิดอื่น โดยใช้เทคนิค real-time quantitative PCR การตรวจพบหรือไม่พบมิวเตชันของ พ่อในพลาสมาแม่ ใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการตัดสินใจที่ จะต้องทำการตรวจแบบ invasive ต่อไปหรือไม่ หากตรวจ ไม่พบยีน $\beta^{41/42}$ mutation ในพลาสมา ก็ไม่จำเป็นต้อง ตรวจแบบ invasive ต่อไปกลุ่มนักวิจัยเดียวกันได้พัฒนา เทคนิคการตรวจให้มีความไวมากขึ้น โดยใช้เทคนิค Single allele base extension / Mass spectrophotometry มา ช่วยในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ได้ผลการตรวจที่มีความ ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น⁽²⁷⁾

สำหรับการประยุกต์ใช้ในประเทศไทยยังถือเป็นเรื่องใหม่และมีการศึกษากันค่อนข้างน้อย กลุ่มวิจัยโรคธาลัสซีเมีย ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้เริ่มทำการศึกษาไป ที่การพัฒนาวิธีการตรวจหาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ พบบ่อยในประเทศไทย เช่น Hb E ก่อน เนื่องจากโรคธาลัสซีเมียที่สำคัญและพบบ่อยของไทย คือ บีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี การตรวจฮีโมโกลบินอีเพียงอย่างเดียวจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคบีตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ของทารกได้ถึงร้อยละ 50 ในการศึกษา จะเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรค จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหา X และ Y-specific sequence (SRY) ดังแสดงใน **รูปที่ 2** เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาจากพลาสมาได้จริง โดยวิธี conventional PCR ผลการตรวจจึงสามารถใช้ในการทำนายเพศทารกได้ด้วย⁽²⁸⁾ จากนั้นจึงค่อยนำไปตรวจหาธาลัสซีเมียที่ต้องการด้วยวิธี PCR ที่เกี่ยวข้องซึ่งมีหลายวิธี เช่น ถ้าเป็นยีน Hb E จะใช้เทคนิค nested PCR / restriction fragment length polymorphism ด้วยเอนไซม์ *Mnl I*⁽²⁹⁾ ผลการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการทำ invasive ได้ในรายที่คู่สมรสมีความเสี่ยงที่จะให้กำเนิดทารกที่จะเป็นโรค β -thalassemia / Hb E เมื่อแม่เป็นพาหะ β -thalassemia พ่อเป็นพาหะ Hb E ในกรณีที่ตรวจไม่พบยีน Hb E ในพลาสมาแม่ การตรวจแบบ invasive อาจไม่จำเป็น เนื่องจากทารกในครรภ์ไม่มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรค β -thalassemia / Hb E เป็นต้น นอกจากนี้ได้พัฒนาเทคนิค quantitative real time PCR สำหรับตรวจ α^0 -thalassemia ในพลาสมาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยภาวะ Hb Bart's hydrops fetalisซึ่งจำเป็นต้องวัดปริมาณ α^0 -thalassemia specific sequence ประกอบการวินิจฉัย⁽³⁰⁾ อย่างไรก็ตามยังอยู่ในระหว่างทำการศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลเพิ่มเติม เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยแบบ invasive ในงานประจำวัน เทคนิคดังกล่าวยังไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจ

ให้บริการจริงแต่อย่างใด ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการตรวจหาดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการในปัจจุบันและแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่จะนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลายต่อไป

นับจากที่ได้มีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ก็ได้มีการพัฒนานำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคต่างๆมากมาย การพบปริมาณ circulating cell-free DNA ในพลาสมา ยังเป็นแหล่งข้อมูลพันธุกรรมแหล่งใหม่สำหรับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แบบ non-invasive ซึ่งทำให้สามารถลดหรือหลีกเลี่ยงการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แบบ invasive และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคที่ต้องทำการตรวจเซลล์ลูกในเลือดแม่แล้ว เห็นได้ชัดเจนว่าการตรวจหาดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่เป็นเทคนิคการตรวจที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ขั้นตอนในการปฏิบัติก็ไม่ยุ่งยาก แต่สิ่งสำคัญที่ควรต้องระลึกถึงเสมอ คือ ดีเอ็นเอทารกในครรภ์ที่จะทำการตรวจนั้นนั้น ถูกแวดล้อมไปด้วยดีเอ็นเอของแม่อยู่เป็นจำนวนมาก การจะนำไปใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์จึงมีข้อจำกัดค่อนข้างมาก และอาจใช้ได้ผลดีกับการวิเคราะห์ DNA sequence ในส่วนที่ทารกได้รับมาจากพ่อ (paternal mutation) เท่านั้น การตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ Y chromosome จึงเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าทารกได้รับพันธุกรรมมาจากพ่อแน่นอน ในอนาคตอาจนำเอาการตรวจทารกในพลาสมาแม่ไปใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์เซลล์ลูกในเลือดแม่เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการวินิจฉัยมากขึ้น หากมีการพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องให้ก้าวหน้าขึ้นนอกจากนี้การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจหา DNA polymorphism หรือ DNA marker อื่นๆที่แตกต่างกันระหว่างพ่อและแม่เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้เพิ่มเติม จะช่วยเพิ่มทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยให้เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางยิ่งขึ้นในอนาคต



รูปที่ 2 การตรวจทำนายเพศทารกในครรภ์โดยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ ด้วยวิธี conventional PCR และตรวจที่จำเพาะต่อ X และ Y-specific sequences ตัวอย่างรายที่ 2,3,5,6, และ 8 แสดงถึงการมีทารกเพศชาย รายที่ 1,4 และ 7 เป็นทารกเพศหญิง (28)

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987; 11: 65-88.
2. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22: 16-29.
3. ถวัลย์วงศ์ รัตนสิริ. การวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย: เทคนิคทางสูติศาสตร์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2538; 5: 71-9.

4. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of α -thalassemia 1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. Clin Genet 1995; 47: 318-20.
5. Siriratmanawong N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Ratanasiri T, Fucharoen S. Simultaneous PCR detection of β -thalassemia and α -thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. Clin Biochem 2001; 34: 377-80.
6. Sanguansermisri T, Thanaratanakorn P, Steger HF, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis by HPLC analysis of hemoglobin in fetal blood samples. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2001; 32: 180-5.
7. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. J Pediatr 1995; 127: 847-56.
8. Schroder J, Tiilikainen A, dela Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. Transplantation 1974; 17: 346-54.
9. Mavrou A, Kolialexi A, Antsaklis A, Krikos X, Koratzis A, Metaxotou C. Detection of fetal NRBCs in maternal blood of pregnant carriers of β -thalassemia using anti- γ and anti- ϵ monoclonal antibodies. Ann NY Acad Sci 2001; 995: 153-5.
10. Winichagoon P, Sithongdee S, Kanokpongsakdi S, Tantisirin P, Bernini LF, Fucharoen S. Noninvasive prenatal diagnosis for hemoglobin Bart's hydrops fetalis. Int J Hematol 2005; 81: 396-9.

11. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
12. Kolialexi A, Tsangaria GT, Antasaklis A, et al. Apoptosis in maternal peripheral blood during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16: 32-7.
13. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-50.
14. van Wijk IJ, de Hoon AC, Jurhawan R, et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem* 2000; 46: 729-31.
15. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-75.
16. Poon LLM, Lo YMD. Circulating fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 151-5.
17. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-24.
18. Botezatu I, Sedyuk O, Potapova G, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequence from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46: 1078-84.
19. Honda H, Miهارu N, Ohashi Y, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110: 75-9.
20. Honda H, Miهارu N, Ohashi Y, Ohashi K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47: 41-6.
21. Facinelli C, Battafarano S, Neri C, et al. First trimester fetal sex prediction by deoxyribonucleic acid analysis of maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 675-80.
22. Lo YMD, Hjelm M, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998; 10: 174-8.
23. Amicucci P, Gennarelli M, Novel G, et al. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 301-2.
24. Chiu RWK, Lau TK, Cheug PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YMD. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002; 48: 778-80.
25. Shimada K, Murakami K, Shozo M, Segawa T, Sumitani H, Inoue M. Sex-determining region Y levels in maternal plasma: evaluation in abnormal pregnancy. *J Obstet Gynecol Res* 2004; 30: 148-54.
26. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of β -thalassemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360: 998-1000.
27. Ding C, Chiu RW, Lau TK, et al. MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive

- prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 10762-67.
28. Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2003; 334: 173-7.
 29. Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. Prenat Diagn 2003; 23: 393-6.
 30. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Development and application of a real time quantitative PCR for detection of fetal α^0 -thalassemia from maternal plasma. Ann NY Acad Sci 2006 (in press).