

Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E/ β -thalassemia

WARUNEE TUNGWIWAT, GOONNAPA FUCHAROEN, SUPAN FUCHAROEN,
THAWALWONG RATANASIRI, KANOKWAN SANCHAISURIYA, and NATTAYA
SAE-UNG

KOHN KAEN, THAILAND

Translational Research 2007;150:319–325

conclusion

- This NIPD methods potentially prove useful for detection of *paternally* inherited mutation and for providing the *exclusion* of pregnancies at risk for this common genetic disorder

Fetal DNA in maternal plasma

Prenatal screening

- Mother and father carry different mutation
 - Detect paternal allele (mutation)
 - Present : either carrier (as father) or affected fetus
 - Absent : fetus is unlikely to be affected
- Mother and father carry same mutation (in case of HbBart's risk)
 - Detect amount of wt and SEA different (cycle threshold : ΔC_t)
- Avoid invasive prenatal diagnosis

Practical points

Fetal sex determination

- NIPD should be offered to all women requesting PND because of the risk of X-linked or CAH, as the need for invasive testing can be reduced by 50%
- Fetal sex determination using cffDNA with real-time PCR is reliable when carried out after 7 weeks gestation.
- Ultrasound scan is required before cffDNA testing to determine the GA and whether it is a multiple pregnancy.
- Parents should be advised of the small risk of discordant results and of the possibility that repeat testing may be required to resolve inconclusive results.
- Ultrasound confirmation of fetal sex is advisable.

Practical points

Single-gene disorders

- Tests for common single gene disorder such as *thalassemia* in certain area is valuable in term of reduction of (invasive) procedure related loss rate
- Tests for sporadic disorders, such as achondroplasia and thanatophoric dysplasia, are becoming available in some laboratories
- Powerful new techniques such as digital PCR and *massively parallel sequencing* have the potential to bring NIPD for single-gene disorders another step closer to widespread clinical use

Practical points

Aneuploidies

- NIPD of aneuploidy is a clinical reality
- A number of methodologies have been trialed and single molecule counting technologies such as massively parallel sequencing, have been the focus of several large-scale validation studies

Burden

- ▶ ด้วยปริมาณของผู้ที่ต้องรับการคัดกรองมีจำนวนมาก ซึ่งโดยเป้าหมายตั้งใจจะให้มากเท่ากับปริมาณผู้ที่มาฝากครรภ์ จึงทำให้ภาระงานมีมากขึ้น ถ้า 100% คือ ประมาณปีละ 800,000 การคัดกรอง ถ้านับเป็นคู่ที่มีผลบวกของภรรยา(30%) จะเพิ่มไปอีก 240,000 การตรวจ
- ▶ ด้วยฐานความรู้ของประชาชนในเรื่องนี้ ยังมีไม่มากพอ จึงเป็นภาระของการต้องให้ข้อมูล ให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ และด้วยเหตุของการตรวจคัดกรองในหญิงตั้งครรภ์ มีอีกหลายเรื่อง ภาระด้านนี้จึงมากขึ้น และต้องพยายามจัดบริการด้านนี้ให้มีประสิทธิภาพด้วยเวลาที่จำกัดและอัตรากำลังที่จำกัดด้วยเช่นกัน

Burden

- ▶ ด้วยอัตรากำลังที่มีอย่างจำกัดและต้องทำงานให้มีคุณภาพสูงตอบสนองความต้องการของผู้รับบริการและการสับเปลี่ยนหมุนเวียนบุคลากรที่ต้องรองรับงานต่าง ๆ ทำให้ความเข้าใจและสมรรถนะด้านนี้ไม่ได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่อง ทำให้ภาระนี้จึงมากขึ้นเช่นกัน
- ▶ ด้วยปริมาณผู้รับบริการที่มาก รวมทั้งการรณรงค์ให้มาฝากครรภ์ให้สามารถเข้าถึงบริการนี้ได้ทันท่วงที จึงทำให้ภาระด้านห้องปฏิบัติการจึงเพิ่มขึ้นเป็นเงาตามตัว

Burden

- ▶ ด้วยองค์ความรู้ที่เพิ่มมากขึ้น เทคโนโลยีที่มีมากขึ้น ภาระด้านค่าใช้จ่ายต่อเรื่องนี้จึงมากขึ้นด้วยเช่น
 - การคัดกรองให้ทราบถึงชนิดของ mutation ของเบต้า ธาลัสซีเมีย ที่จะส่งผลให้การตัดสินใจจะทำหรือไม่ทำ การวินิจฉัยก่อนคลอด หรือใช้ตัดสินใจว่าจะยุติการตั้งครรภ์หรือไม่ในแง่ของการประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยเฉพาะในกลุ่ม β/E thalassemia ทำให้กระบวนการต่างๆในการดำเนินงานมีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ซึ่งก็หมายถึงภาระงานและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับเช่นกัน
 - การวินิจฉัยด้วยเทคนิคชนิดไม่รุกราน(non invasive PND)

การประเมินผลของโครงการ

- ในเขตที่รับผิดชอบควรมีการติดตามประเมินผล
- ควรเข้าใจหลักการติดตามประเมินผล
- ช่วยกันกำกับติดตามและปรับปรุงแก้ไขในส่วนที่เป็นโอกาสพัฒนา

Monitoring of the program

1. New registration cases
2. Data analysis and compare with the expected number

New registration cases

ข้อดี

- ▶ รู้การวินิจฉัยชัดเจน
- ▶ Trace กลับได้ว่า ผาก

ข้อเสีย

ข้อดี

สามารถชี้ให้เห็นได้

ข้อด้อย

- ▶ ระบบการลงทะเบียนกลาง

- ▶ กระจาย รวบรวมได้ยาก

- ▶ มีผลลัพธ์ ออกมาแล้วแก้ไขปัญหายาก

Birth defect registry program

การประเมินผลของโครงการ

► การประเมินกระบวนการ (process evaluation) เช่น

ดูที่ความสำเร็จในการ
กำหนดคู่เสี่ยง (CAR
detection rate)

ร้อยละและจำนวนของสามีที่ได้มาตรวจคัดกรอง

ฉีก่อนคลอด

- จำนวนทารกแรกเกิดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค

รระบบ birth
defect registry ให้
มันคงแข็งแรง

► การประเมินประสิทธิผลของโครงการ

- โดยดูที่ outcome based หรือดูที่ intermediate outcome based ได้เริ่มบ้างแล้วเช่น จำนวนผู้ป่วยเด็กรายใหม่ที่ได้รับการรักษา (ในภาพรวมอาจต้องอาศัยระบบ registration ที่ดี)
- ดูที่ประสิทธิภาพการกำหนดคู่เสี่ยง หรือจะดูผลลัพธ์ทั้งหมดของโครงการ

Prevention and control program in 2 areas: comparison

Area	Pregnant women	PND (cases)	% CAR	β thal major	HbE/ β thal	Hb Bart's hydrops
Area 1	22,238	487	2.18			
Area 2	28,580	134	0.46			

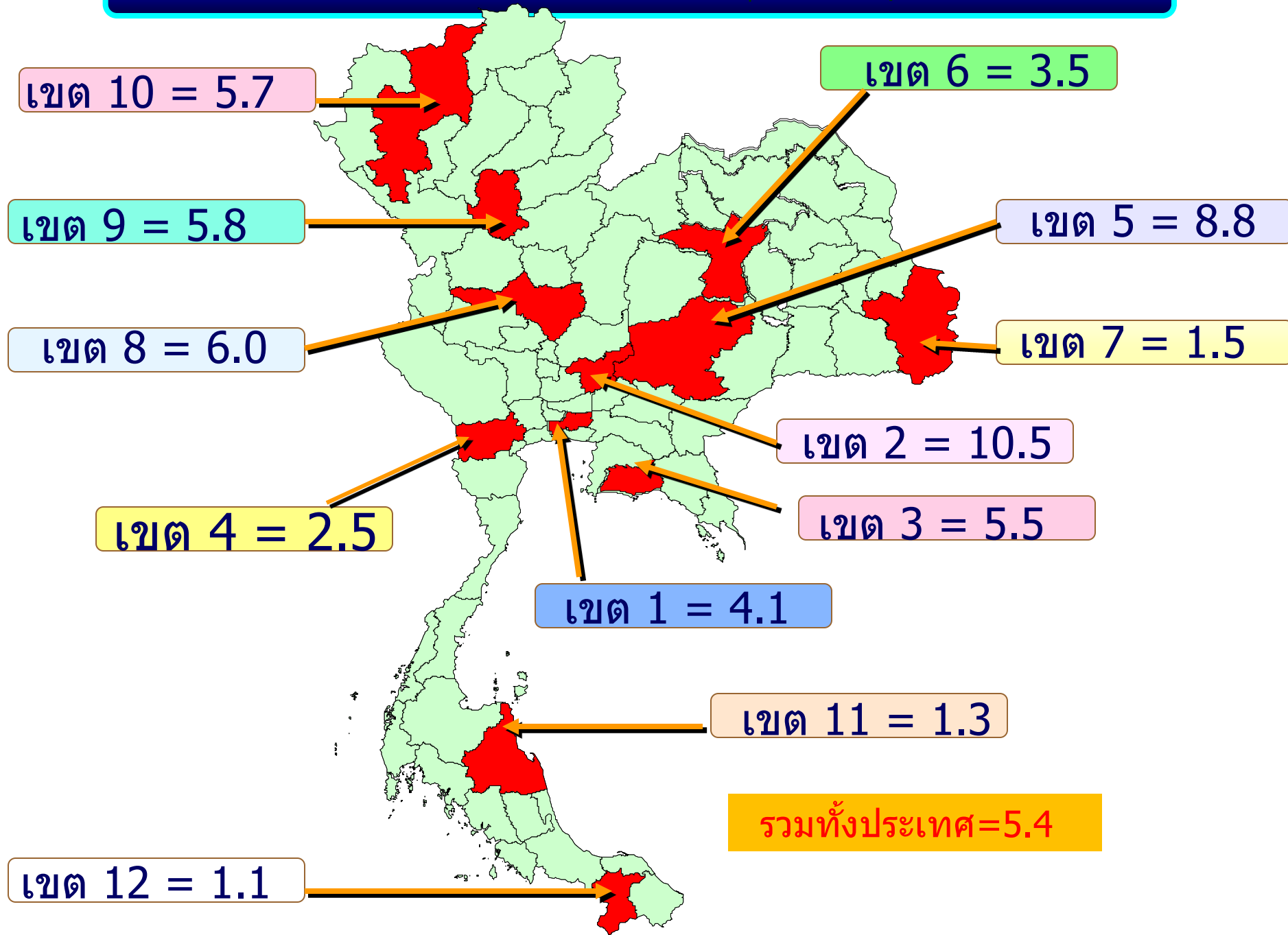
เป้าหมายตาม gene prevalence 2.4 %

Prevention and control program in 2 areas: comparison

Area	Pregnant women	PND (cases)	% CAR	β thal major	HbE/ β thal	Hb Bart's hydrops
Area 1	22,238	487	2.18	98/487=20.1%		
Area 2	28,580	134	0.46	33/134=24.6%		

เป้าหมายตาม AR inherited 25 %

อัตราทารกป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง : 1,000 เกิดมีชีพ



Health promotion
center



Beta-thal trait 6.05%
Hb E trait 11.22%
Homo Hb E 0.73%
Alpha-thal 1 trait 10.63%

Beta-thal major 9:10,000
HbE/beta-thal 19:10,000
Hb Bart's hydrops 28:10,000

Every 1,000 pregnant will have affected fetus

- Hb Bart's hydrops 2 cases
- β -Thalassemia major 1 case
- β -Thal/ Hb E disease 3 cases

6 :1000 Affected
24:1000 CAR
2.4%

ผลลัพธ์ของโครงการเฉพาะผู้ที่มาฝากครรภ์ที่คณะแพทยฯ เชียงใหม่

Year	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	Total
Total screened	2152	1765	1737	1504	1563	1580	1400	1269	1202	1100	1215	16487
Positive cases	634	697	697	487	598	633	403	383	312	322	373	5539
CAR	41	43	47	31	31	32	25	23	25	23	27	348
# Hb Bart's	13	12	12	10	12	12*	10	8	5	5	8	107*
# β thal maj.	7	8	6	3	5	4	2	3	3	2	4	47
# HbE/ β thal	21	23	29	18	14	17*	13	12	17	16	15	195*
Affected	5	7	10	10	7	8	5	6	5	5	7	75

	Number
Total screened	16487
Couple at risk	348
% risk couple	2.11

2.4%

	Number
Total PND	265/348
Affected	75
% affected	28.3

25%

	Number
Total PND	265/348
Affected	75
% affected	28.3

25%

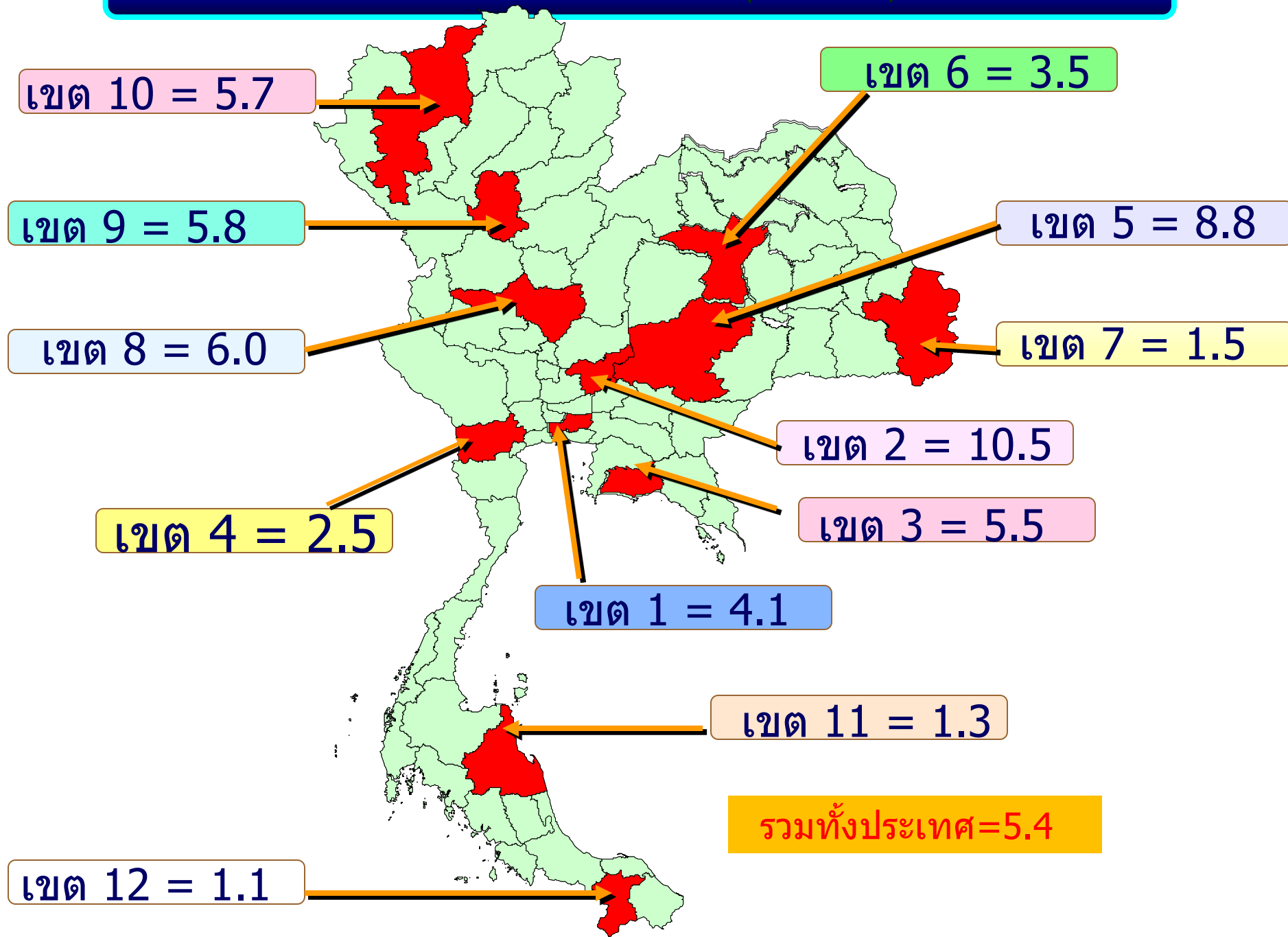
$$348 - 265 = 83$$



- ✓ ไม่ทำ PND 19
- ✓ ไม่มีข้อมูล 32
- ✓ Over GA 15
- ✓ Abortion 16
- ✓ Refused 1

จากจำนวนที่คาดการณ์ความเสี่ยง 2.4% (367 คู่)
 จำนวนคู่เสี่ยงขาดไป 46 ราย (ประมาณ 12.5%)
 ประสิทธิภาพการกำหนดคู่เสี่ยง 87.5%

อัตราทารกป่วยเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง : 1,000 เกิดมีชีพ



ผลลัพธ์ของโครงการ การตรวจคัดกรอง(2556)

เขต	เป้าหมายคัดกรอง	ANC	ผิดปกติ	ร้อยละผิดปกติ
เขต 1	66,799	52,046	21,970	42.21
เขต 2	41,265	32,700	10,615	32.46
เขต 3	34,961	28,633	6,479	22.63
เขต 4	59,695	37,263	16,662	44.72
เขต 5	61,572	44,326	16,668	37.60
เขต 6	68,773	41,767	18,983	45.45
เขต 7	62,074	48,534	14,306	29.48
เขต 8	67,953	54,112	15,297	28.27
เขต 9	80,804	61,063	18,740	30.69
เขต 10	55,090	45,626	11,109	24.35
เขต 11	52,824	41,915	8,613	20.55
เขต 12	55,355	48,730	9,101	18.68
Total	707,165	536,948	176,488	32.87

ผลลัพธ์ของโครงการ การตรวจยืนยันคู่เสี่ยง(2556)

เขต	ใหม่	Screened	Pos/Pos	Total	%CAR	%CAR คาดการณ์	Efficiency(%)
เขต 1	เชียงใหม่	52,046	387+3+4	394	0.76	2.28	33.3
เขต 2	พิษณุโลก	32,700	259+3+1	263	0.80	2.32	34.5
เขต 3	นครสวรรค์	28,633	306+0+0	306	1.07	2.4	44.6
เขต 4	สระบุรี	37,263	226+2+0	228	0.61	4.2	14.5
เขต 5	ราชบุรี	44,326	202+3+0	205	0.46	1.0	46.0
เขต 6	ระยอง	41,767	194+0+0	194	0.46	2.2	20.9
เขต 7	ขอนแก่น	48,534	992+2+0	994	2.05	1.4	146.4
เขต 8	อุดรธานี	54,112	773+2+0	775	1.43	1.4	102.1
เขต 9	นครราชสีมา	61,063	1017+2+0	1019	1.67	3.52	47.4
เขต 10	อุบลราชธานี	45,626				0.6	
เขต 11	สุราษฎร์ธานี	41,915	182+0+0	182	0.43	0.52	82.7
เขต 12	สงขลา	48,730	145+1+1	147	0.30	0.52	57.7
Total		536,948	4,683+18+6	4707	0.88	2.16	40.7

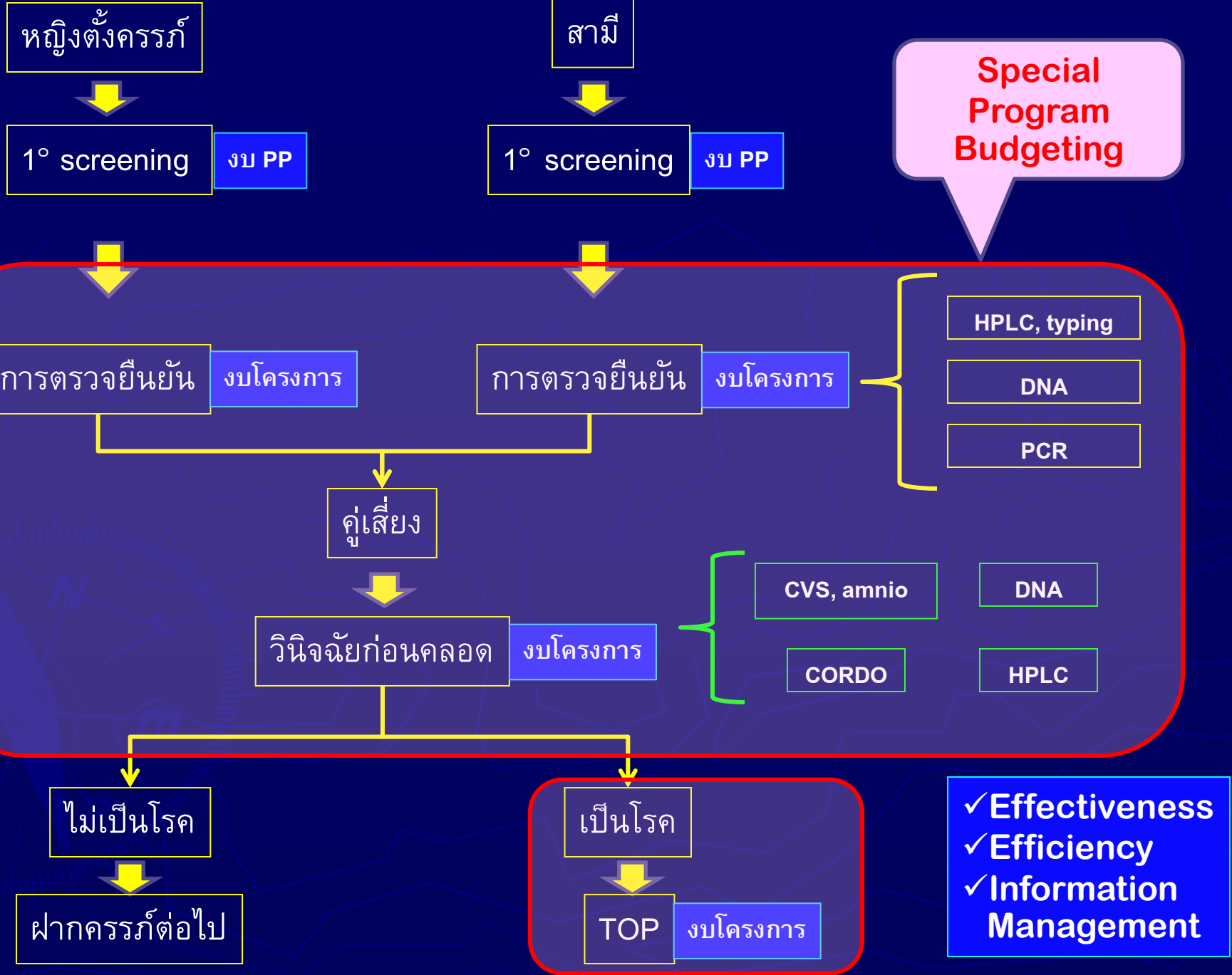
ผลลัพธ์ของโครงการ การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด(2556)

เขต	Amnio	Affected	CVS	Affected	Cordo	Affected	Total	Total affected	%Affected
เขต 1	77	54	62	31	356	83	495	168	33.9
เขต 2	64	52	-	-	12	12	76	64	84.2
เขต 3	49	42	1	1	4	4	54	47	87.0
เขต 4	18	6	-	-	9	9	27	15	55.6
เขต 5	10	10	-	-	1	-	11	10	90.9
เขต 6	3	2	3	3	48	46	54	51	94.4
เขต 7	40	39	5	5	47	44	92	88	95.7
เขต 8	21	18	-	-	9	9	30	27	90.0
เขต 9	26	5	1	1	13	10	40	16	40.0
เขต 10	23	14	1	1	7	7	31	22	70.9
เขต 11	63	63	1	1	3	3	67	67	100.0
เขต 12	2	2	-	-	1	1	3	3	100.0
Total	396	307	74	43	510	228	980	578	58.98

ปัญหาอยู่ที่การกำหนดคู่เสี่ยง ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น

ประสิทธิภาพการกำหนดคู่เสี่ยง

- ระดับรพม. รพศ. (single unit) อยู่ที่ 80-90 %
- ระดับเขต ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 15-150 % (???)
- ระดับชาติ อยู่ที่ระดับ 40 % (ข้อมูลอาจจะคลาดเคลื่อนได้)



หญิงตั้งครรภ์



1° screening

งบ PP

สามี



1° screening

งบ PP

Special
Program
Budgeting

Couple At Risk Detection & PND

ไม่เป็นโรค



ฝากครรภ์ต่อไป

เป็นโรค



TOP

งบโครงการ

- ✓ Effectiveness
- ✓ Efficiency
- ✓ Information Management

สรุปแนวคิดการพัฒนางานควบคุมและป้องกัน

- ▶ สร้างความชัดเจนเรื่องความรับผิดชอบในงานแต่ละด้านของกระบวนการ
 - ผู้ที่จะนำพาหญิงตั้งครรภ์มาเข้าระบบเร็วที่สุด: รพ.สต., สอ.,
 - สถานบริการที่จะตรวจกรองเบื้องต้น(MCV + HbE screen)
 - สถานที่ที่จะตรวจยืนยันจนทราบว่า เป็นหรือไม่เป็นคู่เสี่ยง โดยไม่ต้องให้ค่อย ๆ ส่งทีละการทดสอบ
 - ระบุสถานที่ที่จะต้องส่งตัวไปทำการวินิจฉัยก่อนคลอด
- ▶ สร้างระบบติดตามประเมินผลอย่างชัดเจน

สรุปแนวคิดการพัฒนางานควบคุมและป้องกัน

- ▶ พัฒนาการตรวจที่ง่ายขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่น IC strip test for α -thal, test for β mutation
- ▶ พัฒนางานด้าน non-invasive ต่อเนื่อง
- ▶ พัฒนางานด้านการให้คำปรึกษา แนะนำทางพันธุศาสตร์ ที่มีประสิทธิภาพ

บทสรุปในเรื่องนี้

- เป็นโครงการนี้ผ่านกระบวนการคิดอย่างดี รวมทั้งได้รับการพิสูจน์มาจากหลาย ๆ แห่งแล้วว่าเป็นโครงการที่มีคุณค่า
 - ในแง่ของหลักการและเหตุผลที่ดีของโครงการ
 - ในแง่ของความคุ้มค่าคุ้มทุน
 - เป็นการให้กระบวนการต่าง ๆ เป็นการตอบโจทย์ให้กับครอบครัวต่าง ๆ ที่จะมีทางเลือกแบบเข้าใจ
- ทำให้ภาระดังกล่าวดังกล่าวไม่ควรจะเป็นอุปสรรคต่อการดำเนินงาน แต่ควรจะเป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่การปรับปรุงแก้ไข เพื่อดำเนินงานต่อได้อย่างราบรื่น อันจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยทั้งทางตรงและทางอ้อม ต่อครอบครัว ต่อสังคมและประเทศชาติโดยรวมต่อไป



Thank you for
your attention

วัดพระบาทสัรอย อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่