

บทความพิเศษ

Highlight of HKSHI Master Class 2017

ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ อรรถพล ศรีสุชาติ ศรีประไพ ชนุนทอง และ พชรินทร์ บุญปกครอง
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตขาวและเกล็ดโลหิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็นห้องปฏิบัติการที่ทำหน้าที่ในการตรวจเอชแอลเอ เพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะ และมีหน้าที่ในการจัดหาผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ขึ้นทะเบียนไว้ในธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตแห่งชาติ ทั้งนี้ การพัฒนาเทคนิคการตรวจเอชแอลเอ และการจัดหาผู้บริจาคให้เหมาะสมกับผู้ป่วยจึงต้องได้รับการอบรม เรียนรู้อย่างต่อเนื่องจากผู้ที่มีความชำนาญทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นได้มีโอกาสเข้าร่วมการประชุม HKSHI Master Class 2017 ณ เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นเวลา 2 วัน ตั้งแต่วันที่ 23-24 มิถุนายน ค.ศ. 2017 ผู้จัดการประชุมคือ The Hong Kong Society for Histocompatibility and Immunogenetics (HKSHI)¹ เป็นองค์กรจัดตั้งขึ้นตั้งแต่วันที่ 8 กรกฎาคม ค.ศ. 2011 วัตถุประสงค์หลักคือเพื่อนำไปสู่ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์การศึกษและการประยุกต์ใช้ Histocompatibility and Immunogenetics เพื่อสนับสนุนมาตรฐานสากลของห้องปฏิบัติการทดสอบความเข้ากันได้และภูมิคุ้มกันวิทยา อีกทั้งเป็นเวทีในการแลกเปลี่ยนความรู้และข้อมูลเสริมสร้างความร่วมมือสื่อสารแลกเปลี่ยนความคิดเห็นระหว่างผู้ที่มีความชำนาญทั้งในประเทศและต่างประเทศในด้าน Histocompatibility and Immunogenetics โดยมี Dr. Janette Knok เป็นประธานการจัดงาน

1. หัวข้อการประชุม ประกอบด้วย

1.1 Effective HLA Lab QA/QC program บรรยายโดย Associate Professor Dr. Neng YU (Histocompatibility Laboratory/Memorial Campus Hospital Laboratories, University of Massachusetts Memorial Medical Center Worcester, MA, USA)

1.2 Natural Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors (KIR) บรรยายโดย Professor Carolyn Katovich Hurley, Ph.D., D(ABHI) (Department of Oncology, Georgetown University Medical Center, Washington DC, USA)

1.3 HLA, Drug hypersensitivity and Vaccine บรรยายโดย Dr. Wen-Hung Chung (Director of Drug Hypersen-

sitivity Clinical and Research Center, Department of Dermatology, Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan)

1.4 การคัดเลือกผู้บริจาค unrelated stem cell บรรยายโดย Professor Carolyn Katovich Hurley

1.5 HLA Informatics Tools to an Unrelated Donor Search บรรยายโดย Professor Carolyn Katovich Hurley

1.6 การทำ HLA typing ด้วยเทคนิค Sanger Sequencing Base Typing (SBT) กับ Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide probe (PCR-SSO) บรรยายโดย Professor Carolyn Katovich Hurley

2. รายละเอียดแต่ละหัวข้อการประชุม มีดังนี้

2.1 Effective HLA Lab QA/QC program มีรายละเอียดเกี่ยวกับการจัดทำระบบ QA/QC program ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

- 1) การทำ Quality Assurance Program ควรจะมีข้อกำหนดวิธีปฏิบัติ รายชื่อผู้ปฏิบัติ รายชื่อผู้ประเมิน ระยะเวลาที่ชัดเจน และตรงตามมาตรฐาน
- 2) มีนโยบายและแผนการปฏิบัติงาน โดยมีการแจ้งให้กับเจ้าหน้าที่ทุกคน ผู้มีส่วนได้เสียรวมถึงลูกค้าทราบถึงรายละเอียดที่ชัดเจน รวมถึงการให้ความรู้กับเจ้าหน้าที่เพื่อให้สามารถปฏิบัติตามมาตรฐานที่กำหนดได้
- 3) กำหนดหน้าที่ความรับผิดชอบให้กับทีม QA โดยเจ้าหน้าที่มีส่วนร่วมในการปฏิบัติ รวมทั้งสามารถสื่อสารให้กับเจ้าหน้าที่ทุกระดับได้

4) การนำระบบ QA/QC มาปฏิบัติภายในห้องปฏิบัติการและการติดตามเพื่อประเมินประสิทธิภาพ

ปัญหาที่พบในการดำเนิน QC/QA² program

Coverage: โปรแกรม Quality assurance ที่ต้องครอบคลุมตามข้อกำหนด (ควรดำเนินการ QA program อ้างอิงตามความต้องการของมาตรฐานที่เกี่ยวข้อง)

1) Tasks: สิ่งใดบ้างที่ต้องมีการควบคุม และมีความถี่ (ควรมีการบริหารโดยกำหนดแผนงาน QA/QC)

2) Tracking and documentation: เจ้าหน้าที่ต้องติดตาม สามารถสร้างทีมให้เห็นถึงความสำคัญของงานที่เจ้าหน้าที่

ต้องรับผิดชอบ จัดทำเอกสาร การเข้าถึงข้อมูลได้ และมีสถานที่จัดเก็บเอกสารที่เหมาะสม

3) Performance: มีบันทึกอัตราความผิดพลาดที่เกิดขึ้น การวิเคราะห์และแก้ไขปัญหา (กำหนด KPI ที่ชัดเจนและเหมาะสมของ QA/QC)

4) Cost: การดำเนินการทำ QA/QC ที่เหมาะสมควรพิจารณางบประมาณที่ห้องปฏิบัติการมี (ควรประเมินอย่างมีระบบจำเพาะ และเหมาะสมกับมาตรฐาน)

การทำ QA/QC สำหรับงาน HLA typing ที่เกี่ยวข้องสำหรับงาน PCR-based assays มีดังนี้

- ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับการทดสอบ
- ปริมาณตัวอย่างและ PCR reaction ที่เหมาะสม
- การจัดเก็บตัวอย่างและดีเอ็นเอที่เหมาะสม
- ระบบการคัดทั้งตัวอย่างและดีเอ็นเอตามเกณฑ์ที่กำหนด
- การจัดการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ
- การควบคุมและจัดเก็บน้ำยาเมื่อรับน้ำยา Lot/shipment/primers-probes หรือขณะทดสอบ
- การควบคุมคุณภาพ internal control ในการทดสอบแต่ละครั้ง
- การประเมิน amplification verification
- การประเมิน/การแก้ไข/การรายงาน ambiguity
- การประเมิน wipe tests อย่างเหมาะสมโดยกำหนดเวลาตามความถี่ของเหตุการณ์ที่เกิดผิดพลาด
- การดำเนินการแก้ไขเมื่อพบภาวะ contamination
- ข้อกำหนดในการยอมรับและเกณฑ์การปฏิเสธผลการทดสอบ
- การแปลผลการทดสอบ และการตรวจสอบความถูกต้อง (two independent reviews)
- การปรับปรุงฐานข้อมูลของเอชแอลเอ (IMGT HLA database) อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

การควบคุมคุณภาพในการตรวจเอชแอลเอที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการทดสอบ เช่น

1) เทคนิค PCR-SSP ควรพิจารณาถึงส่วนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ DNA (source, quality, quantity, integrity), primers (sensitivity, specificity), control (IQC ที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบ amplification failures), contamination, limitation ของน้ำยาทดสอบ (allele dropout, mutation, false reaction), amplicon (วิธีการประเมิน amplicon ที่เหมาะสม)

2) เทคนิค PCR-SSO ควรพิจารณาส่วนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ primers (amplicon, coverage, drop-out), probe (signal to noise ratio, cross-reactivity), hybridization (temperature, time), wash buffer ที่เหมาะสมกับการใช้งาน limitation ของน้ำยาทดสอบ (allele dropout, false reaction, assignment by negative dropout) สำหรับการทำให้ quality control ในน้ำยา PCR-SSO ต้องพิจารณาถึงขอบเขตการทำ QC โดยต้องควบคุมคุณภาพน้ำยาตามรุ่นการผลิตใหม่ การตรวจสอบน้ำยาจากการขนส่งทุกครั้ง การทดสอบ primer set ชุดใหม่ และการประเมิน database ชุดใหม่

3) เทคนิค microcytotoxicity assay ควรพิจารณาส่วนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ cells (quantity, purity and viability), serum (quantity, purity and interfering substances), complements (potency, cell specific, method specific and appropriate storage), control (cell and method specific)

สำหรับการกำหนดตารางการปฏิบัติงาน QA/QC calendar และกำหนดผู้รับผิดชอบที่ชัดเจนว่าควรมีการควบคุม QA/QC ในการดำเนินการตามระยะเวลา ได้แก่

1) Daily QA/QC ประกอบด้วย การตรวจสอบระบบอุณหภูมิ (temperature, alarm and humidity) และการตรวจสอบ internal quality control (IQC) ของห้องปฏิบัติการ (reagent performance, IQC each test, quantitative material)

2) Weekly QA/QC ประกอบด้วย instrument maintenance, wipe test สรุปการประชุมของห้องปฏิบัติการและพิจารณาปัญหาที่พบในแต่ละอาทิตย์

3) Monthly QA/QC ประกอบด้วยสรุปการประชุมของห้องปฏิบัติการ (ต้องมีอย่างน้อยเดือนละครั้ง) สรุปผลระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ (Lab CE session) รายงาน IQC collection และรายงานการเปลี่ยนแปลงของระบบคุณภาพที่มีการเปลี่ยนแปลง (การเปลี่ยนแปลงต่างๆ เช่น ชื่อ สถานที่ ผู้จัดการ ที่ปรึกษาต่างๆ ควรปรับปรุงแก้ไขภายใน 30 วันหลังจากรับแจ้ง)

4) Quarterly QA/QC ประกอบด้วย การประเมินและติดตามผลระบบ QA/QC

5) Semiannually QA/QC ประกอบด้วย การอบรมบุคลากรใหม่ การทบทวนเอกสาร SP และ WI การประเมินระบบคุณภาพด้วย proficiency testing (ปีละ 1 ครั้ง) และการประเมินผลการทดสอบของเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบต่างๆ

6) Annually QA/QC ประกอบด้วย การประเมินผลและ

คัดเลือก proficiency testing การประเมินความสามารถของเจ้าหน้าที่ โปรแกรมการแปลผลต่างๆ และการ update ข้อมูลเกี่ยวกับ genetic database

7) Biennially QA/QC ประกอบด้วย การตรวจประเมินคุณภาพบุคคลจากภายนอกห้องปฏิบัติการ การควบคุมเอกสารไว้ในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 ปี

8) Routine or as needed QA/QC ประกอบด้วย wipe test (เพื่อป้องกันการเกิด contamination) การประเมินความสามารถทางเทคนิค (อย่างน้อยทุกๆ 6 เดือน หรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงวิธีการหรือเครื่องมือต่างๆ) การทำ six area evaluation (การสังเกต ณ จุดปฏิบัติงานในการทดสอบ การลงบันทึก/แปลผลผลการทดสอบ หรือ proficiency test การบำรุงรักษาอุปกรณ์ การทดสอบด้วยตัวอย่างชนิด blind samples รวมทั้งการแก้ไขในกรณีที่เกิดปัญหาต่างๆ)

2.2 Natural Killer Cell Immunoglobulin-Like

Receptors (KIR)

Natural killer cells (NK cells) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่หลั่งสาร cytokines และทำลาย target cells เช่น เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการกระตุ้นจากแอนติเจนนั้นมาก่อน Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) เป็น glycoprotein มีการแสดงออกอยู่บนผิวเซลล์เป็น receptor ที่อยู่บนผิวของ NK cell ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ NK cells ซึ่ง ligand ของ KIR คือ HLA Class I molecule เป็นการจับแบบจำเพาะ การถ่ายทอด KIR gene และ ligand ของ KIR จึงไม่จำเป็นต้องไปด้วยกัน ดังนั้นพี่น้องที่เป็น HLA identical กัน อาจจะมี KIR haplotype ที่

แตกต่างกันได้ KIR family แบ่งเป็น inhibitory และ activating รวมเป็นจำนวน 14 proteins (Figure 1) ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต NK cells มีความสำคัญดังนี้

1. T cells และ NK cells มีบทบาทที่สำคัญในการฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยโรค acute myeloid leukemia (AML)

2. KIR protein มีความสำคัญต่อการเกิด graft versus leukemia (GvL)

3. เลือกผู้บริจาคที่มี specific KIR alleles จะส่งผลดีต่อ outcomes

4. HLA matching เป็นปัจจัยทางด้านผู้บริจาคที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตมากที่สุด ผู้บริจาคที่มี HLA mismatch กับผู้ป่วยจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด graft rejection, GVHD และ transplant-related mortality

2.3 HLA, Drug hypersensitivity and Vaccine

การแพ้ยาจัดเป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่พบบ่อยที่สุด โดยพบได้ตั้งแต่อาการที่ไม่รุนแรง เช่น ผื่น ผื่นลมพิษ จนถึงอาการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงที่อาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ได้แก่ Stevens-Johnson syndrome (SJS), toxic epidermal necrolysis (TEN), drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) หรือ hypersensitivity syndrome (HSS) ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยที่พบว่า การแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงที่เกิดจากยาบางชนิดมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA ของผู้ป่วยซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการแพ้ยาทางผิวหนัง

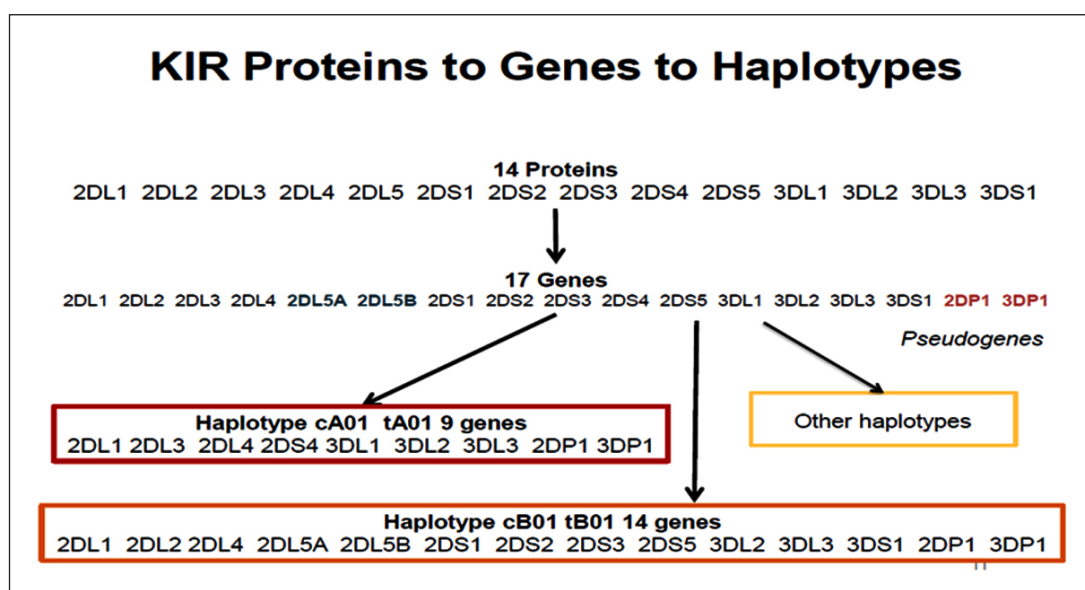


Figure 1 KIR proteins and KIR genes

ชนิดรุนแรงจากยาบางชนิดได้ ทำให้ผู้ป่วยได้รับความปลอดภัยจากการใช้ยามากยิ่งขึ้น รวมทั้งลดอัตราการพิการ หรือสูญเสียชีวิตที่เกิดขึ้นจากการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงเหล่านั้นด้วย ยาที่เป็นสาเหตุสำคัญของการแพ้ยาได้แก่ ยาปฏิชีวนะ nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ยาแก้ชักกลุ่มอะโรมาติก carbamazepine/phenytoin ยารักษาโรคเกาต์ allopurinol และยาต้านไวรัส เช่น nevirapine และ abacavir เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพันธุกรรมของยีน HLA กับการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA มีความสัมพันธ์กับการแพ้ยาทางผิวหนังของยาหลายชนิด เช่น

1. HLA-B*58:01 กับการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงจากยา Allopurinol
2. HLA-B*15:02 กับการแพ้ยาทางผิวหนังจากยา Carbamazepine (CBZ)
3. HLA-B*15:02 กับการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงจากยา Phenytoin
4. HLA-B*57:01 กับการแพ้ยาทางผิวหนังจากยา Abacavir
5. HLA-B*35:05 กับการแพ้ยาทางผิวหนังจากยา Nevirapine
6. HLA ต่างๆ กับยา Sulfonamide

กลไกการเกิดปฏิกิริยาการแพ้ยาทางผิวหนังนั้น ยาสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่เป็นผลทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ยาชนิดที่เกิดขึ้นช้า (delayed drug hypersensitivity reaction) เช่น การแพ้ยาทางผิวหนัง พบว่า เกิดจากการที่ CD4+ และ CD8+ T cells สามารถจับกับโมเลกุลของยาผ่าน T cell receptor (TCR) เป็นผลทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ต้องอาศัย HLA โดยโครงสร้างของยาที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจน หรือ antigenic determinant ที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ (specific antibody) ต่อยาได้นั้น โดยอาจเป็นโครงสร้างทั้งโมเลกุล หรือเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งของโมเลกุลยาก็ได้ HLA-B*58:01 และ HLA-B*15:02 มีความสัมพันธ์กับการแพ้ยาทางผิวหนังชนิดรุนแรงจากยา Allopurinol และ Phenytoin HLA-B*15:02, B*57:01, B*35:05 มีความสัมพันธ์กับการแพ้ยาทางผิวหนังจากยา Carbamazepine, Abacavir และ Nevirapine และพบว่า การแพ้ยา Sulfonamide มีความสัมพันธ์กับยีน HLA หลายชนิด

2.4 การคัดเลือกผู้บริจาค unrelated stem cell

ข้อมูลจาก Central for International Blood and Marrow

Transplant Research (CIBMTR) แสดงความสัมพันธ์ HLA mismatch ของ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DOB1 และ -DPB1 กับการเพิ่ม mortality เมื่อ HLA mismatch ใน loci ของ HLA-A, -B, -C และ -DRB1 ที่ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตลดลง

- การปลูกถ่ายแบบ HLA 7/8 match โดยที่ DRB1 mismatch จะมีโอกาสเกิด mismatch ที่ DQ เพิ่มอีก ทำให้มีความเสี่ยงต่อการรอดชีวิตของผู้ป่วย เนื่องจาก DRB1 ส่วนใหญ่ จะมีการถ่ายยีนไปด้วยกันกับ DQ ซึ่งจะมีผลต่อ clinical outcome
- การปลูกถ่ายแบบ HLA 8/8 match หรือ 10/10 match พบว่า ผู้ป่วยได้รับ stem cell จากการ match แบบ non-permissive HLA-DPB1 allele mismatch จะมีการรอดชีวิตน้อยกว่า permissive HLA-DPB1 allele mismatch
- T cell epitope (TCE) groups เป็นกลุ่มที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการจับกันระหว่าง T cell และ HLA-DPB1 บางชนิดซึ่งมีการแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงทางภูมิคุ้มกัน การเลือกผู้บริจาคแบบ 9/10 non-permissive HLA-DPB1 mismatch จะทำให้เพิ่ม overall mortality หากเลือกผู้บริจาคแบบ 9/10 permissive HLA-DPB1 mismatch จะให้ผล outcome ไม่แตกต่างจาก 10/10 non-permissive HLA-DPB1 mismatch
- การเลือกผู้บริจาคแบบ low expression HLA loci (LEL) แบบ 7/8 match พบว่า 3 LEL mismatch จะมีผลต่อ survival ที่ลดลง
- การเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสม โดยพิจารณาเฉพาะ HLA match ควรเลือกผู้บริจาคที่มี 8/8 match (HLA-A, -B, -C, -DRB1) หรือ 10/10 match (HLA-A, -B, -C, DRB1, -DOB1) ร่วมกับการพิจารณา permissive DPB1 TCE match จะทำให้อัตราการรอดชีวิตดีขึ้น
- การพิจารณาอายุ และเพศผู้บริจาค หากผู้บริจาคมีอายุน้อย จะทำให้การรอดชีวิตของผู้ป่วยดีมากว่าผู้บริจาคอายุมาก และเมื่อผู้บริจาคเป็นเพศหญิง ส่วนใหญ่มีปริมาณ stem cells น้อยกว่าเพศชาย ทำให้ปริมาณ stem cells ไม่เพียงพอ ดังนั้นหากเป็นผู้บริจาคเพศหญิงควรบริจาคแบบ peripheral blood stem cells (PBSC) ดีกว่า bone marrow นอกจากนี้ ผู้บริจาคเพศหญิงบริจาค stem cells ให้ผู้ป่วยเพศชายจะทำให้เกิด GVHD เพิ่มขึ้น ในขณะที่ผู้บริจาคเป็นเพศชาย จะมีผลดีลดการเกิด chronic GVHD

- การพิจารณา CMV serology status หรือ ABO blood group ควร match กัน ซึ่งจะทำให้ overall survival ดีกว่า mismatch

ดังนั้นการพิจารณาผู้บริจาค ควรเรียงลำดับความสำคัญ ซึ่งจะมีผลสำเร็จต่อการปลูกถ่ายไขกระดูก ดังนี้

- 1) HLAmatch (อย่างน้อย HLA-A, -B, -C, -DRB1) อายุของผู้บริจาค, ABO, CMV และ เพศ รายละเอียดดังแสดงใน Figure 2

2.5 HLA Informatics Tools to an Unrelated Donor Search

การ assign ผล HLA ของผู้ป่วย และการเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสม โดยใช้ web-based HLA tools ดังนี้

1. HLA nomenclature รูปแบบการรายงานผลเป็น G group, alleles, allele associations
2. การ matching ผู้บริจาคกับผู้ป่วยที่เหมาะสมด้วยโปรแกรมที่สามารถพิจารณา linkage of B~C, alleles or antigens, limit secondary loci allele mismatches, DRB3/4/5, DOB1, Impacted by DRB1 mismatch selected
3. การพิจารณา sensitization of patient to specific HLA เช่น permissive DPB1 mismatch
4. Evaluate matching กับครอบครัวมีโอกาส HLA match 25%
5. Confirm patient HLA สามารถ identify haplotypes ของครอบครัวได้ด้วยโปรแกรม Haplostats ซึ่งจะต้องมีผล HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DOB1

Evaluate results of unrelated donor / cord blood search เลือกผู้บริจาคตามความเหมาะสม แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ adult volunteer, cord blood และ international search

2.6 การทำ HLA typing ด้วยเทคนิค Sanger sequencing Base typing (SBT) กับ Polymerase Chain Reaction–Sequence Specific Oligonucleotide probe (PCR-SSO)³

HLA match มีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยปลูกถ่ายไขกระดูก และการพบผู้บริจาคที่ HLA match กับผู้ป่วยมะเร็งได้เร็วขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตและหายป่วย จึงทำให้ registry บางแห่งมีการพัฒนาตรวจ HLA typing เป็นระดับ high resolution การรายงานผลในระดับ high resolution แบ่งเป็น 2 ชนิด ดังนี้ ชนิดที่ 1 เป็นการรายงานผลแบบ G code หรือ P code ซึ่งประกอบด้วย alternative alleles ที่สามารถได้มาจากการทดสอบด้วยเทคนิค Sanger sequencing Base Typing (SBT) และ PCR-SSO จัดว่าเป็นการรายงานผลในระดับดี ซึ่งใน G code และ P code ประกอบด้วย allele ที่มี nucleotide base เหมือนกันใน exon 2, 3 ใน HLA class I และ exon 2 ใน HLA class II ซึ่งทำให้ทราบโปรตีนที่แสดงออกในบริเวณ Antigen Recognition Domain (ARD) สำหรับนำเสนอต่อ T cells เพื่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และชนิดที่ 2 เป็นการรายงานผลแบบ single allele ด้วยการทดสอบจากเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) จัดว่าเป็นเทคนิคที่สามารถรายงานผลได้ดีที่สุดในปัจจุบันสามารถทราบข้อมูล nucleotide base ที่ถูกต้องมากกว่าวิธี SBT และได้ข้อมูลยีนทั้งหมดแบบ full gene⁴ ที่มีข้อมูลยีนละเอียดมากกว่าระดับอื่นๆ ปัจจุบันเทคนิค sequencing เป็นที่ยอมรับมากที่สุดในการตรวจ HLA typing แบ่งเป็นเทคนิคย่อยที่นิยมใช้กันจะมี 2 เทคนิคคือ เทคนิค Sanger และ NGS ซึ่งเทคนิค NGS เป็นเทคนิคที่ดีที่สุด แต่มีข้อจำกัดคือมีขั้นตอนมาก และ ต้องมีบุคลากรที่มีความชำนาญมาก นอกจากนี้ เทคนิค SBT หรือ PCR-SSO เพียงเทคนิคเดียว ไม่สามารถรายงานผลออกผลในระดับ high resolution ได้ทั้งหมด จากข้อจำกัดดังกล่าว นำไปสู่การประยุกต์ 2 เทคนิคของ SBT และ PCR-SSO เข้าด้วยกัน เพื่อลดขั้นตอนที่

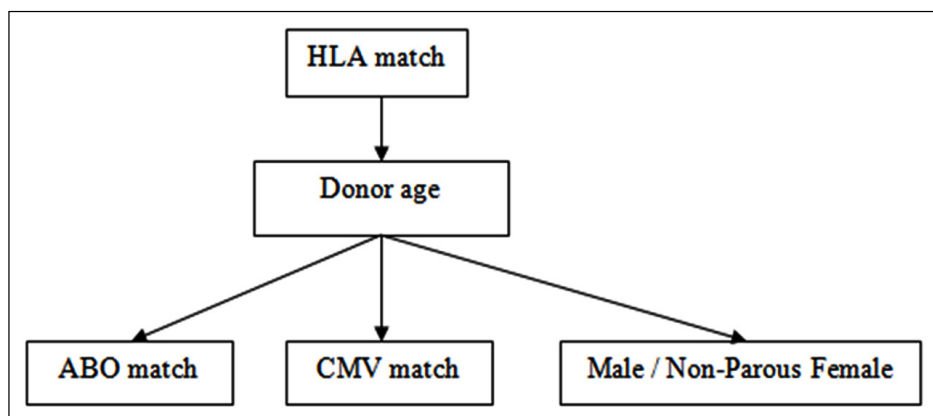


Figure 2 Priority of donor selection factors should be considered for donor selection

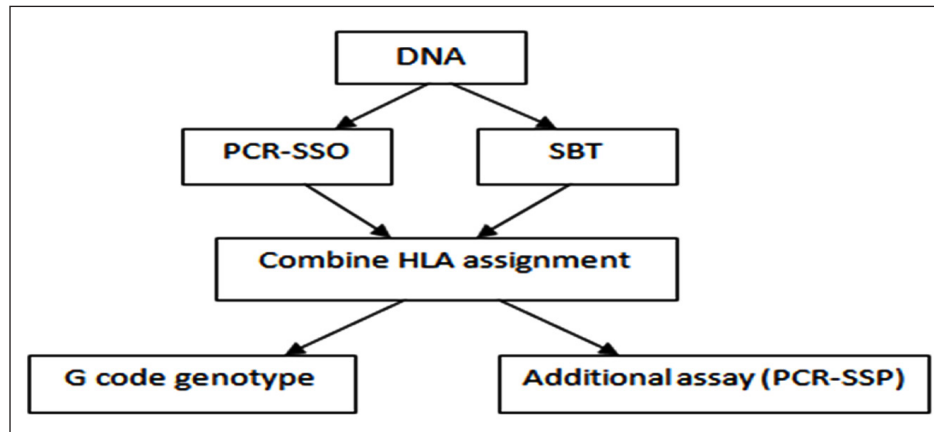


Figure 3 Combining SBT with PCR-SSO results in HLA typing

ยุ่งยาก ลดเวลา ดังนั้นทีมวิจัยของมหาวิทยาลัย Georgetown, USA จึงประยุกต์เทคนิค SBT in house และ PCR-SSO commercial kit (One Lambda HD Typing Kit, USA) แล้วนำผลทั้งสองวิธีมาพิจารณาแปลผลด้วยกันแล้วนำผลการทดสอบที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลทดสอบของเทคนิค NGS โดยแสดงขั้นตอนการทำงานตามรูป flow chart (Figure 3) ดังนี้

จากผลการทดสอบ HLA-A, -B, -C loci ในตัวอย่างผู้บริจาค 96 ราย ใช้เวลาทดสอบและแปลผล จำนวน 2 วัน แต่ถ้าว้อย่างผู้บริจาค 10 ราย ใช้เวลาทดสอบและแปลผลจำนวน 1 วัน ซึ่งสามารถแปลผลออกมาเป็น G code ได้มากกว่าร้อยละ 95 โดยไม่ต้องทำการทดสอบซ้ำ (ผลถูกต้องอยู่ในช่วงร้อยละ 96-99) มีกรณีที่บางรายไม่สามารถแปลผลเป็น G code ได้ คิดเป็นร้อยละ 1-4 และ พบว่าร้อยละ 0.7 เป็น allele ที่มีโปรตีนแสดงออกนอกบริเวณ ARD - encoding exons ซึ่งจะต้องนำไปทดสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR-SSP commercial kit (One Lambda, USA) และสามารถออกผลได้ในวันถัดไป สำหรับการแปลผลต้องอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูปชื่อ One Lambda Fusion (PCR-SSO) และ Connexio Genomics Assign™ (SBT) เมื่อเปรียบเทียบผลกับ NGS พบว่าให้ผล concordant 99% (Table 1) สำหรับการทดสอบ HLA-DRB1, -DQB1 และ -DPB1 อยู่ในระหว่าง validation การทดสอบด้วยเทคนิค SBT หรือ NGS มีขั้นตอนการทำงานค่อนข้างมากและซับซ้อน จึงเสี่ยงต่อการสลับตัวอย่าง การเตรียมน้ำยาผิดพลาด การผิดขั้นตอน เป็นต้น ดังนั้นจะต้องใช้เครื่องหยดสารอัตโนมัติ (Liquid handling) นอกจากนี้ SBT หรือ NGS มีข้อมูลยีนที่ค่อนข้างมาก ซึ่งจำเป็นต้องมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการแปลผลและมีข้อแนะนำเพิ่มเติมจากผู้บรรยายสำหรับการเตรียมตัวอย่าง ควรเตรียม DNA จากเลือดจะมีคุณภาพดีกว่า buccal swabs และ ควร update version IMGT/HLA database เป็นประจำเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องมากขึ้น

สำหรับการดำเนินการของห้องปฏิบัติการเมดิคอลิตชาวและเกิลด์โลทิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในปัจจุบันมีดังนี้

1. การนำระบบ QA/QC ในการตรวจ HLA เทคนิค PCR-SSO, Real time PCR โดยได้รับการรับรองระบบคุณภาพ ISO 15189 ได้แก่ คุณภาพ DNA การประเมินคุณภาพน้ำยา สิ่งปรับปรุงเพิ่ม คือ การนำระบบ QA/QC calendar มาจัดทำเป็นแผนงานเพื่อใช้ภายในห้องปฏิบัติการ โดยให้ทราบกำหนดการในการติดตามงานต่างๆ ตามเวลาที่เหมาะสม ซึ่งทำให้ผู้จัดการห้องปฏิบัติการสามารถติดตามงานได้ตลอดเวลา และการจัดการ EQA/EQ เพื่อให้มีประสิทธิภาพ โดยควรมีเจ้าหน้าที่กำกับดูแลงานทั้งหมดของ EQA ได้แก่ RiQAS, ASHI, AHIA, UKNEQAS, RCPAมาตรฐานทอง และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. การตรวจ HLA typing ในอาสาสมัครบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต การปลูกถ่ายอวัยวะในผู้ป่วย และการตรวจเพื่อพิจารณา HLA associated disease ด้วยเทคนิค PCR-SSO โดยได้รับความรู้มาพัฒนา ดังนี้คือ 1) การนำข้อดีและข้อเสียของเทคนิคพิจารณา เพื่อปรับปรุงเทคนิคการตรวจให้ผลละเอียดยิ่งขึ้น โดยเปรียบเทียบเทคนิค SSO+SBT กับเทคนิค NGS และได้ประเมินข้อดี ข้อเสียของเทคนิค ซึ่งเทคนิค SSO+SBT มีข้อดีสามารถลดขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลาทดสอบน้อยกว่า รายงานผลในระดับ high resolution ได้ และสามารถนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อทำนาย HLA matching ในฐานข้อมูลอาสาสมัครขึ้นทะเบียนบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต มีข้อเสีย คือ ในบางตัวอย่างที่ต้องนำไปทดสอบซ้ำจากข้อจำกัดของน้ำยา มีข้อมูลยีนที่จำกัดเฉพาะบริเวณ ARD จึงทำให้ไม่ทราบข้อมูลยีนบริเวณอื่นที่เปลี่ยนแปลงไป (variation) ซึ่งอาจเป็น new allele และ ให้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์เบสแบบรวม 1 ชุด 2) มีความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับ HLA alleles ที่สามารถทำปฏิกิริยากับยาแล้วเกิดอาการแพ้

Table 1 Comparison of combined PCR-SSO and SBT versus NGS

Characteristics	Methods	
	PCR-SSO + SBT	NGS
Number of reads	1 read	More than >10,000 reads
Allele information	Antigen Recognition Domain(ARD) - encoding exons	Full gene or whole gene
% concordance	>95%	99.99%
Allele resolution	G code (good)	Single allele (very good)
Allele phasing	None	Available
Processing	1. PCR set up 2. PCR clean up 3. Sequencing amplification 4. Alcohol clean up	1. PCR set up 2. Amplicon Quantitation and normalization 3. Library preparation 4. Size selection 5. Library quantitation (complicated process)
Turn around time	2-3 days	4-5 days
Analyzed program	1. One Lambda Fusion (PCR-SSO), USA 2. Connexio Genomics Assign™ (SBT), Australia	Genomics Assign™ MPS, Connexio Inc., Australia
Applications	1. Routine 2. Stem cell registration	1. Routine 2. Stem cell registration 3. Research

ยา (hypersensitivity) ซึ่งเป็นแนวทางในการ design primer สำหรับการตรวจหาชิ้นเนื้อก่อนใช้ยาให้กับโรงพยาบาลที่ขอตรวจได้

3. การตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตาย (cadaveric donor) ด้วยเทคนิค Real time PCR ซึ่งสามารถ ตรวจ HLA locus อื่นได้เพิ่มเติม HLA-C, -DQA1, -DPA1 และ -DPB1

4. ได้รับความรู้เพิ่มเติมในการคัดเลือกผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต ดังนี้คือ 1) แนวทางการคัดเลือกผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตตาม priority ดังนี้ HLA match (อย่างน้อย HLA-A, -B, -C, -DRB1) อายุของผู้บริจาค ABO blood group CMV และเพศ เพื่ออบรมให้เจ้าหน้าที่งาน search stem cell มีความเข้าใจและใช้ความรู้ในการประสานงานกับแพทย์ 2) ได้รับความรู้เพิ่มเติมเรื่อง Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) สำหรับเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมกับผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นอีกหนึ่งทางเลือก เพื่อช่วยผู้ป่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งซ้ำ (relapse)

จากการเข้าร่วมประชุมครั้งนี้ ได้มีแนวทางในการพัฒนาการตรวจ HLA typing ในอาสาสมัครบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต โดยเทคนิค NGS ซึ่งมีแนวทางในการดำเนินงานดังนี้

ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ NGS โดยประเมินความรู้ความสามารถเจ้าหน้าที่ จำนวนเจ้าหน้าที่ในการทดสอบ เตรียมขออัตรา กำลังเพิ่ม ประเมินอุปกรณ์ และเครื่องมือมีการเตรียม validation จัดเตรียมตัวอย่างการประเมินผล ทดสอบประเมินผล สรุปผลเพื่อพิจารณาการจัดซื้อและเตรียมการทดลองระบบการตรวจ NGS ใน platform ที่จัดซื้อได้เตรียมพื้นที่เพื่อรองรับเครื่องมือ

ประโยชน์ของการตรวจ HLA typing โดยเทคนิค NGS เนื่องจากเทคนิค NGS เป็นเทคนิคที่ทันสมัย และดีที่สุดเพราะให้ผลการตรวจที่ละเอียด ทำให้มีการพัฒนาการตรวจในอาสาสมัครบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในประเทศไทย และพัฒนาบุคลากรให้มีความรู้เท่าเทียมต่างประเทศ อีกทั้งสามารถเป็นศูนย์การฝึกอบรมเทคนิคที่ทันสมัยให้กับหลายประเทศ ผลการตรวจระดับ high resolution ที่มีความถูกต้องแม่นยำ ทำให้แพทย์มี

ความมั่นใจในผลการทดสอบที่นำไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของผู้ป่วย นอกจากนี้ผล HLA typing ที่ระบุความละเอียดของผู้บริจาคทำให้ลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยในการตรวจ HLA เพิ่มเติมในผู้บริจาค อีกทั้งลดระยะเวลาในการค้นหาผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มีผลตรงกับผู้ป่วย ผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตได้รวดเร็ว

4. ต้นทุนในการตรวจด้วยวิธี NGS ราคาถูกกว่าการส่งตรวจห้องปฏิบัติการภายนอก ในต่างประเทศ สามารถตรวจได้พร้อมกันจำนวนมาก (high throughput) เหมาะสมกับงานการตรวจในงานธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประเมิน haplotype frequencies เพื่อประเมินโอกาสการหาผู้บริจาค

อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิค NGS ต้องมีการวางเครื่องมือใหม่ ต้องมีการจัดเตรียมพื้นที่ ปรับปรุงให้เหมาะสมทั้งอุณหภูมิและความชื้น การป้องกัน contaminate เจ้าหน้าที่จะต้องทดลองระบบการทำงาน เพื่อให้ได้ปริมาณงาน และ turn around time ที่เหมาะสม NGS เป็นเทคนิคที่มีหลายขั้นตอน ต้องมีการอบรม และการทำ checklist ทุกขั้นตอนเป็นอย่างดี เพื่อลดการเกิด human error

สรุป

จากการเข้าร่วมประชุม HKSHI Master Class 2017 ห้องปฏิบัติการได้รับความรู้และแนวทาง ดังนี้ 1) การทำ Quality Assurance Program ควรกำหนดนโยบายและแผนการปฏิบัติงานตรงตามมาตรฐาน และการติดตามเพื่อประเมินประสิทธิภาพ

2) Natural killer cells (NK cells) มีบทบาทสำคัญในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ส่วนใหญ่พบในผู้ป่วยโรค Acute Myeloid Leukemia (AML) 3) พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน HLA มีความสัมพันธ์กับการแพ้ยาทางผิวหนังของยาหลายชนิด 4) การพิจารณาผู้บริจาค ได้แก่ linkage of B~C, allele or antigen, limit secondary loci allele mismatches, DRB3/4/5, DQB1 และ impacted by DRB1 mismatch อีกทั้งเรียงลำดับความสำคัญจาก HLA match อายุของผู้บริจาค ABO blood group CMV และเพศ ซึ่งจะส่งผลสำเร็จต่อการปลูกถ่ายไขกระดูก 5) การรายงานผล HLA ระดับ high resolution มีผลดีต่อการคัดเลือกผู้บริจาค ทั้งนี้ควรรวบรวมข้อดี ข้อเสีย มาพิจารณาเพื่อเลือกเทคนิคที่เหมาะสมกับงาน

เอกสารอ้างอิง

1. Transplant Conferences. HKSHI Master Class 2017. June 23-24, 2017. Hong Kong.
2. Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) Bylaws. [Effective Date: 2017 Sep 1; cited 2018 Jan 14]. Available from: https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1201/optn_bylaws.pdf#nameddest=Appendix_C.
3. Tu B, Masaberg C, Hou L, Behm D, Brescia P, Cha N, et al. Combining one-step Sanger sequencing with phasing probe hybridization for HLA class I typing yields rapid, G-group resolution predicting 99% of unique full length protein sequences. *HLA*. 2017;89:90-7.
4. Serov YA, Barkhatov IM, Klimov AS, Berkos AS. Current methods and opportunities of next-generation sequencing (NGS) for HLA typing. *CTT*. 2016;5:63-70.