นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเพื่อประเมินน้ำยาตรวจหาอัลลีล HLA ด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing

พัชรินทร์ บุญปกครอง[1] ศรีประไพ ขนุนทอง[1] ธมลวรรณ ทัพมงคล[2] อรรถพล ศรีสุดดี[1] ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ[1] และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง[3]

[1]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย [2]ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย [3]บัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

ความเป็นมา *ปัจจุบันมีผู้ป่วยคนไทยจำนวนมากที่ขึ้นทะเบียนรอรับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจาก Thai Stem Cell Donor Registry แต่ยังไม่สามารถหาผู้บริจาคที่ไม่ใช่ญาติที่มี human leukocyte antigens (HLA) ตรงกัน ปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการคัดเลือกคือ การตรวจชนิดของอัลลีล HLA ในผู้บริจาคที่รายงานผลเป็น low/intermediate resolution ทำให้ต้องใช้เวลาตรวจ high resolution เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของอัลลีล HLA ทั้ง HLA-A, -B, -C และ -DRB1* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อประเมินชุดน้ำยาตรวจหาอัลลีล HLA แบบ high resolution ด้วยเทคนิค next generation sequencing (NGS)* ***วัสดุและวิธีการ*** *ประเมินการตรวจอัลลีล HLA ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผลแล้ว 24 ตัวอย่างโดยใช้ชุดน้ำยาของบริษัทต่างประเทศ และเปรียบเทียบผลการตรวจอัลลีล HLA ทั้ง 5 loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1) กับผลที่ได้จากโครงการทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจ HLA* ***ผลการศึกษา*** *ผลตรวจอัลลีล HLA ถูกต้องเป็น single allele ของแต่ละ locus แบบ 4 ตำแหน่งด้วยชุดน้ำยา 3 บริษัท คือ Holotype HLA 99.05%; NGSgo 98.18% และ AllType NGS assay 99.09% ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจทั้งหมดนั้นแตกต่างกัน ตั้งแต่ 31 ชั่วโมง (AllType NGS assay) 32 ชั่วโมง (NGSgo) และ 41 ชั่วโมง 30 นาที (Holotype HLA) ตามลำดับ ข้อจำกัดในการแปลผลเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์ของอัลลีล HLA ที่แตกต่างกัน โปรแกรมการวิเคราะห์และประสบการณ์ของบุคลากร ทำให้เวลาของการประมวลผลแตกต่างกัน* ***สรุป*** *การศึกษานี้ได้ประเมินชุดน้ำยาของบริษัทต่างประเทศเพื่อตรวจอัลลีล HLA ระดับ high resolution ด้วยเทคนิค NGS โดยตรวจในตัวอย่างควบคุมคุณภาพซึ่งผลการตรวจถูกต้องมากกว่าร้อยละ 98 แต่มีความแตกต่างกันในเรื่องของระยะเวลา ขั้นตอนการตรวจและการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ชุดน้ำยาอาจต้องพิจารณาความเหมาะสมเรื่องต้นทุนน้ำยาและจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบด้วย*

คำสำคัญ : ● *HLA typing* ● *Allele* ● *Next generation sequencing*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2561;28:249-57.

ได้รับต้นฉบับ 6 กรกฎาคม 2561 รับลงตีพิมพ์ 23 สิงหาคม 2561

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พัชรินทร์ บุญปกครอง หน่วยห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดขาวและเกล็ดโลหิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 E-mail: patcharin.b@redcross.or.th

Original Article

Evaluation of Test Kits for HLA Allele Detections Using Next Generation Sequencing Technique

Patcharin Boonpokkrong[1], Sriprapai Khanuntong[1], Tamonwan Tupmongkol[2], Atthapol Srisuddee[1], Sirilak Phiancharoen[1] and Oytip Nathalang[3]

[1]National Blood Centre, Thai Red Cross Society; [2]Organ Donation Centre, Thai Red Cross Society; [3]Graduate Program, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Abstract:

Background: *Currently, many Thai patients who have registered for unrelated stem cell donors from the Thai Stem Cell Donor Registry (TSCDR) but could not find human leukocyte antigens (HLA) - matched donors. One factor that influenced the selection was donors' HLA allele typing results reported as low/intermediate resolution. Thus, more time was needed to perform high resolution typing in order to identify HLA-A, -B, -C and -DRB1 alleles.* ***Objective:*** *To evaluate next generation sequencing (NGS) platforms for high resolution HLA allele typing.* ***Materials and Methods:*** *HLA allele typing was performed in 24 known DNA samples using commercial reagent kits. The HLA typing results of 5 loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1) were compared with the results obtained from the proficiency testing programs.* ***Results:*** *The three commercial kits could identify 4 digits resolution typing of each locus and the concordance with the known alleles was 99.05%, 98.18% and 99.09% for Holotype HLA, NGSgo, and AllTypeNGS assay, respectively. Times requiring for the whole process of typing varied from 31 hours (AllTypeNGS assay), 32 hours (NGSgo) and 41 hours and 30 minutes (Holotype HLA), respectively. Test limitations were due to different primer design and software analysis.* ***Conclusion:*** *In this study, we evaluated NGS platforms for high resolution HLA typing. All kits were able to give HLA typing results as the same alleles with more than 98% accuracy. Differences in testing time, procedures and program analysis were found. However, the analysis for cost of reagents and number of samples tested are needed to be considered before HLA typing by NGS can be implemented in TSCDR.*

Keywords : ● *HLA typing* ● *Allele* ● *Next generation sequencing*

J Hematol Transfus Med 2018;28:249-57.

บทนำ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็นองค์กรที่ได้รับการอนุมัติจากแพทยสภา ให้ดำเนินการจัดตั้ง Thai Stem Cell Donor Registry (TSCDR) ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2545[1] เพื่อหาผู้บริจาคที่ไม่ใช่ญาติ (unrelated donors) และมี human leukocyte antigens (HLA) ตรงกันกับผู้ป่วย ทั้งนี้ได้เริ่มทำการตรวจ HLA-A และ HLA-B ในอาสาอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการจำนวน 1,652 ราย และศึกษาความถี่ของแอนติเจน HLA-A และ HLA-B พบว่ามีการกระจายของแอนติเจนแตกต่างกันในกลุ่มประชากรแต่ละภาคของประเทศไทย ดังนั้นการเพิ่มจำนวนอาสาสมัครจะส่งผลให้มีโอกาสในการพบแอนติเจน HLA ชนิดที่พบน้อยได้ดีขึ้น[2] หลังจากนั้นได้เพิ่มการตรวจ HLA-DRB1 และต่อมาในปี พ.ศ. 2556 ได้เพิ่มการตรวจ HLA-C ในอาสาสมัครรายใหม่ทุกราย จนถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 มีอาสาสมัครที่ขึ้นทะเบียนและมีผลการตรวจ HLA จำนวน 181,919 ราย อย่างไรก็ตามยังคงมีผู้ป่วยคนไทยที่ขึ้นทะเบียนรอรับบริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ไม่พบผู้บริจาคที่มี HLA เหมือนกันประมาณร้อยละ 50 ปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลต่อการคัดเลือกคือ การตรวจชนิดของอัลลีล HLA ในผู้บริจาคซึ่งรายงานผลเป็น low/intermediate resolution ทำให้ผู้ป่วยต้องรอนานขึ้น เพราะต้องใช้เวลาตรวจ high resolution เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของอัลลีล HLA ทั้ง HLA-A, -B, -C และ -DRB1[3]

ตามข้อกำหนดของ World Marrow Donor Association (WMDA) การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในกรณีผู้บริจาคที่ไม่ใช่ญาติควรเลือกผู้บริจาคที่มี HLA เหมือนกันมากที่สุด เพื่อให้เซลล์ที่ปลูกถ่ายให้ผู้ป่วยอยู่ได้นานและลดการเกิด graft-versus-host disease (GVHD) จากรายงานการศึกษาของต่างประเทศพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มี HLA-A, -B, -C และ -DRB1 แบบ 8/8 match[4] และ/หรือ HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1 แบบ 10/10 match[5] มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่เป็น HLA mismatch บางกรณีควรพิจารณาความเข้ากันได้ของ HLA-DRB3/4/5, -DQB1 และ -DPB1 ร่วมด้วย กล่าวคือผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคที่เป็น HLA-A, -B, -C และ -DRB1 แบบ 7/8 match ร่วมกับ HLA-DRB3/4/5, -DQB1 และ -DPB1 mismatch ตั้งแต่ 3 อัลลีลขึ้นไปจะมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าผู้ป่วยที่ได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่เป็น HLA-A, -B, -C และ -DRB1 แบบ 7/8 match ร่วมกับ HLA-DRB3/4/5, -DQB1 และ -DPB1 mismatch แบบ 0-1 อัลลีล[4] จากรายงานผู้ป่วยในประเทศสหรัฐอเมริกา ชนิดของอัลลีล HLA ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยคือ HLA-A, -B, -C และ -DRB1 และในประเทศญี่ปุ่นผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มี mismatch ของ HLA class I คือ HLA-A, -B และ -C มีโอกาสรอดชีวิตน้อยกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มี HLA class I match และ ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มี HLA-DRB1 และ -DQB1 mismatch จะมีโอกาสเสี่ยงทำให้เกิด acute graft-versus-host disease (aGVHD) และมีอัตราการตายมากกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มี HLA-DRB1 และ -DQB1 match[6] ซึ่งความเข้ากันได้ต้องพิจารณาผลการตรวจอัลลีล HLA ระดับ high resolution โดยผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตด้วย HLA match ระดับ high resolution มีการรอดชีวิตมากกว่าผู้ป่วยที่รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตด้วย HLA match ระดับ low/intermediate resolution[5]

เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ที่ใช้ตรวจ HLA typing รายงานผลได้หลายระดับคือ low/intermediate และ high resolution วิธี PCR-sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) และ PCR-sequence specific primer (PCR-SSP) เป็นวิธีที่รายงานผลเป็น low/intermediate resolution การตรวจใช้เวลานานและต้องมีขั้นตอน post PCR ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ ในปี พ.ศ. 2560 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติร่วมมือกับศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย นำวิธี real-time PCR มาใช้ในงานตรวจผู้บริจาคไตสมองตาย พบว่าขั้นตอนและเวลาการตรวจอัลลีล HLA น้อยกว่าทั้งสองวิธีที่กล่าวข้างต้น อีกทั้งสามารถรายงานผลอัลลีลได้เพิ่มถึง 11 loci (HLA-A -B -C -DRB1 -DRB3/4/5 -DQA1, -DQB1, -DPA1 และ -DPB1) แต่ผลการตรวจรายงานเป็น low/intermediate resolution[7] ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจ HLA ระดับ high resolution โดยใช้เทคนิค sequence-based typing (SBT) และ next generation sequencing (NGS) เพื่อช่วยแก้ปัญหาผลการตรวจอัลลีล HLA บางชนิดที่ยังไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจนด้วยวิธีอื่นซึ่งวิธี SBT และ NGS สามารถรายงานผลอัลลีลได้ชัดเจนและถูกต้องแม่นยำ[8] อีกทั้งวิธี NGS สามารถตรวจหาลำดับเบสในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็วพร้อมกันหลายตัวอย่าง (high-throughput)[9] ส่งผลให้ต้นทุนการตรวจต่อตัวอย่างมีราคาลดลงเมื่อเทียบกับวิธี PCR-SSP[10,11] แต่มีข้อจำกัดคือต้องอาศัยบุคลากรที่มีประสบการณ์ในการแปลผลการตรวจ แต่อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาใช้เทคนิคที่เป็น semi-automated NGS[12] ซึ่งสามารถตรวจอัลลีล HLA ที่ระบุความละเอียด 4-6 ตำแหน่ง และช่วยลดปัญหาการรายงานผลที่ไม่ชัดเจนได้ จึงเหมาะสำหรับการตรวจในผู้ป่วยรอการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่มีความจำเป็นต้องใช้ผล

อัลลีล HLA ระดับ high resolution การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินชุดตรวจหาอัลลีล HLA ด้วยเทคนิค NGS โดยใช้น้ำยาจากบริษัทต่างประเทศและประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดเลือกผู้บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผลการตรวจอัลลีล HLA ระดับ high resolution จำนวน 24 ตัวอย่าง ตามจำนวนน้ำยาที่บริษัทให้เพื่อการทดสอบโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ซึ่งเป็นตัวอย่าง external quality control ที่ไม่ได้ขออนุมัติจริยธรรมการวิจัยในคนเพราะไม่สามารถระบุข้อมูลส่วนบุคคลได้ ประกอบด้วยตัวอย่างจากการเข้าร่วมโครงการทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจ HLA ของ Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association (APHIA) และ The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) จำนวน 22 ตัวอย่าง และจากโครงการ Proficiency testing เพื่อการจัดสรรอวัยวะ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทยจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นดีเอ็นเอตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2560 รายละเอียดดังแสดงใน Table 1

วิธีการศึกษา

นำตัวอย่าง DNA ทั้ง 24 ตัวอย่างมาทดสอบหาอัลลีล HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1 ด้วยชุดน้ำยาของบริษัทต่างประเทศ 3 บริษัท คือ Holotype HLA (Omixon Ltd., Budapest, Hungary); NGSgo (GenDx, Utrecht, Netherlands) และ AllType NGS assay (One Lambda, Thermo Fisher Scientific, Canoga Park, CA, USA) โดยน้ำยาทั้ง 3 บริษัทใช้ปริมาณ DNA ตั้งต้น 1.35 μg, 0.9 μg และ 0.05 μg ต่อ 1

Table 1 HLA typing results of 24 known DNA samples

Sample	HLA alleles									
No.	A	A	B	B	C	C	DRB1	DRB1	DQB1	DQB1
1	23:01	29:02	53:01	81:01	06:02	18:01	08:04	13:02	04:02	06:04
2	02:02	23:01	15:16	44:10	04:01	14:02	07:01	15:03	02:02	06:02
3	02:01	68:02	08:01	55:01	03:03	03:04	08:01	13:04	03:19	04:02
4	74:01	-	35:01	53:01	04:01	16:01	01:02	11:01	03:19	05:01
5	01:01	26:01	07:02	08:01	03:04	07:02	13:04	15:01	03:19	06:02
6	02:02	23:01	15:16	44:10	04:01	14:02	07:01	15:03	02:02	06:02
7	24:02	68:01	40:01	44:02	03:04	16:04	04:04	11:04	03:01	03:02
8	29:02	33:03	15:31	45:01	04:27	16:01	04:01	15:03	03:02	06:02
9	23:17	68:15	08:01	15:10	03:04	07:01	03:01	11:01	02:01	06:02
10	02:01	03:01	15:01	27:05	02:02	03:04	04:01	13:01	03:02	06:03
11	74:01	-	15:03	50:01	02:10	06:02	03:02	13:02	04:02	06:09
12	02:02	68:02	42:01	53:01	04:01	17:01	03:01	08:04	02:01	04:02
13	29:02	68:02	13:02	15:37	03:04	06:02	01:01	03:01	02:01	05:01
14	23:01	33:03	07:02	18:01	05:01	07:02	11:01	14:54	03:19	05:03
15	02:01	11:01	27:02	56:01	01:02	02:02	01:01	16:01	05:01	05:02
16	02:01	03:01	15:01	27:05	02:02	03:04	04:01	13:01	03:02	06:03
17	02:01	02:05	27:05	50:01	01:02	06:02	01:01	07:01	02:02	05:01
18	11:01	24:02	15:01	15:12	03:03	04:01	11:01	12:02	03:01	-
19	23:01	74:01	15:03	58:02	02:10	06:02	03:01	07:01	02:01	02:02
20	01:37	32:01	40:02	57:01	02:02	06:02	07:01	15:01	03:03	06:02
21	02:01	31:01	15:17	51:01	07:01	15:02	04:07	13:02	03:01	06:04
22	11:01	26:01	35:01	38:01	02:02	12:03	10:01	11:01	03:01	05:01
23	02:07	30:01	13:02	46:01	01:33	06:02	04:05	09:01	03:03	04:01
24	11:01	24:07	27:06	35:05	03:04	04:01	12:02	14:05	03:01	05:03

Table 2 The NGS primer sets of each vender were used to identify HLA alleles

Commercial kit	Primer set	Targeted region
Holotype HLA	HLA-A,-B,-C,-DQB1	Whole gene
	HLA-DRB1	Intron 1 to exon 5
NGSgo	HLA-A,-B,-C	Whole gene
	HLA-DRB1, -DQB1	Exon 2,3
AllType NGS assay	HLA-A,-B,-C,	Whole gene
	HLA-DRB1, -DQB1	Exon 2 to 3' UTR

ตัวอย่าง ในขั้นตอนการทำ PCR amplification ตามลำดับ สำหรับ primers ของ AllType NGS assay เป็น multiplex ที่ประกอบด้วย primers รวม 11 loci ใน PCR reaction เดียวกัน primers ของ Holotype HLA และ NGSgo เป็น singleplex ที่มี primers แยกตามชนิด locus เช่น สำหรับการตรวจ 5 loci ต้องเตรียม PCR reactions 5 ตัวอย่าง รายละเอียดของชุด primers แต่ละบริษัทแสดงใน Table 2 ในขั้นตอน size selection ของ Holotype HLA จะใช้ pippin prep แต่ NGSgo และ AllType NGS assay ใช้ magnetic beads เพื่อแยกขนาด amplicon และในขั้นตอน quantitation ของ AllType NGS assay จะใช้เครื่อง fluorometer (Qubit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) แต่ NGSgo และ Holotype HLA ใช้เครื่อง real-time PCR (LightCycler 480, Roche Molecular Systems, CA, USA) สำหรับเครื่อง sequencer ที่ใช้กับน้ำยา Holotype HLA และ NGSgo เป็น เครื่อง Miseq (Illumina, CA, USA) น้ำยา AllType NGS assay ใช้เครื่อง Ion S5 (One Lambda, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) โดยทำการทดสอบตามขั้นตอนปฏิบัติในคู่มือการใช้งานและข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อ ดังแสดงใน Figure 1

ข้อมูลลำดับเบสแต่ละเส้นที่ได้จากเครื่อง sequencer จะออกมาในรูปแบบ FASTQ file จากน้ำยา NGSgo ของบริษัท GenDx และ น้ำยา Holotype HLA ของบริษัท Omixon หรือ BAM file จากน้ำยา AllType NGS assay ของบริษัท One Lambda และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมการแปลผลของแต่ละบริษัท ซึ่งโปรแกรม HLA Twin (Omixon Ltd., Budapest, Hungary) ใช้กับน้ำยา Holotype HLA, โปรแกรม NGSengine (GenDx, Utrecht, Netherlands) ใช้กับน้ำยา NGSgo และ โปรแกรม Type Stream (One Lambda, Thermo Fisher Scientific, Canoga Park, CA, USA) ใช้กับน้ำยา AllType NGS assay ได้ข้อมูลออกมาเป็น HLA allele แล้วนำมาวิเคราะห์หาร้อยละของความสอดคล้องของแต่ละอัลลีล ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลการตรวจ HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1 ระดับ high resolution ของชุดตรวจทั้ง 3 บริษัท กับผลการตรวจตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ได้จากโครงการทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจ HLA

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบด้วยชุดน้ำยาตรวจหา HLA อัลลีล ชนิด HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1 ระดับ high resolution ด้วยเทคนิค NGS ของชุดตรวจทั้ง 3 บริษัทจากอัลลีลทั้งหมด 108 คู่อัลลีล จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าผลตรวจถูกต้องเป็น single allele ของแต่ละ locus แบบ 4 ตำแหน่ง โดยน้ำยา Holotype HLA สามารถแปลผลถูกต้องเป็น single allele จำนวน 107 คู่อัลลีล (99.07%) มีตัวอย่าง 1 ราย คือ หมายเลข 17 ไม่สามารถแยกคู่อัลลีล HLA-A ได้ ส่วนน้ำยา NGSgo สามารถแปลผลถูกต้องเป็น single allele จำนวน 106 คู่อัลลีล (98.15%) มีตัวอย่าง 2 รายคือ หมายเลข 3 และ 23 ไม่สามารถแยกคู่อัลลีล HLA-DRB1 ได้ และน้ำยา AllType NGS Assay สามารถแปลผลถูกต้องเป็น single allele จำนวน 107 คู่อัลลีล (99.07%) โดยตัวอย่างหมายเลข 5 ไม่สามารถแยกอัลลีล HLA-B ได้ รายละเอียดดังแสดงใน Table 3 และ Table 4

เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการปฏิบัติงานของทั้ง 3 บริษัทตั้งแต่ขั้นตอน PCR amplification จนถึงรายงานผล HLA typing พบว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจทั้งหมดของชุดน้ำยา Holotype HLA, NGSgo และ AllType NGS Assay คือ 41 ชั่วโมง 30 นาที 32 ชั่วโมง และ 31 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งเวลาที่แตกต่างกันนี้เนื่องจากขั้นตอนการปฏิบัติงานมีความแตกต่างกัน ชุดน้ำยา Holotype HLA และ NGSgo ใช้ระยะเวลาในขั้นตอน PCR amplification 7 ชั่วโมง 30 นาที ขณะที่ชุดน้ำยา AllType NGS Assay ใช้เวลาในการทำ PCR amplification เพียง 2 ชั่วโมง 30 นาที ส่วนชุดน้ำยาของ AllType NGS Assay มีขั้นตอน purification เพิ่มหลังขั้นตอน PCR amplification และชุดน้ำยาของ Holotype HLA มีขั้นตอน amplicon normalization เพิ่มหลังจากทำ amplicon

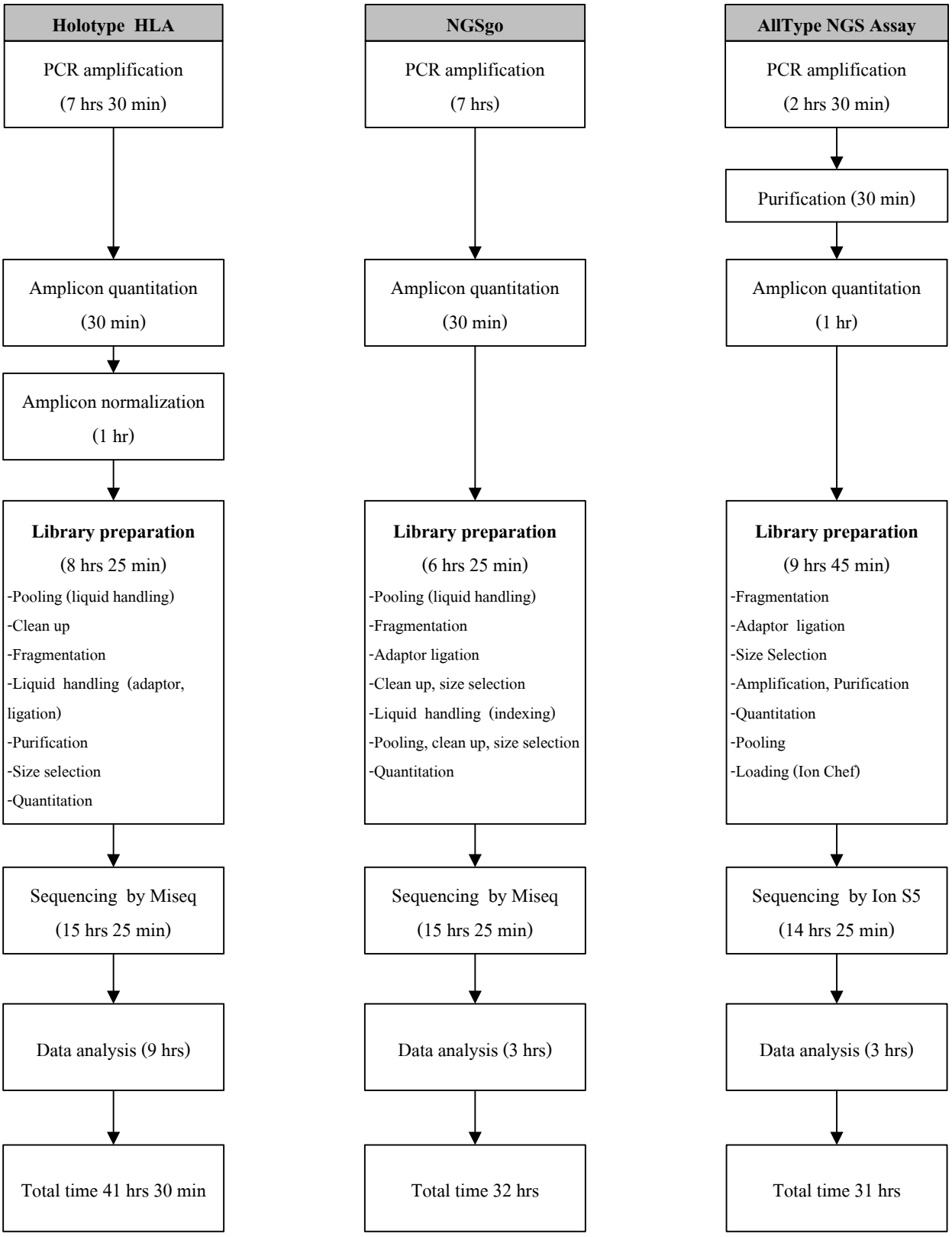

Figure 1 Next generation sequencing workflow for HLA typing among 3 venders

Table 3 Concordance rate compared with the EQC HLA typing results

	% Concordance		
HLA locus	**Holotype HLA**	**NGSgo**	**AllType NGS Assay**
HLA-A	95.24	100.00	100.00
HLA-B	100.00	100.00	95.45
HLA-C	100.00	100.00	100.00
HLA-DRB1	100.00	90.91	100.00
HLA-DQB1	100.00	100.00	100.00
Average	99.05	98.18	99.09

Table 4 HLA allele discrepancies reported by 3 venders

Sample No.	**Results reported by**		
	Holotype HLA	**NGSgo**	**AllType NGS Assay**
HLA-A			
(No. 17)	A*02:01, 02:05	A*02:01, 02:05	A*02:01, 02:05
	A*02:14, 02:22		
HLA-B			
(No. 5)	B*07:02, 08:01	B*07:02, 08:01	B*07:02, 08:01
			B*08:156, 42:01
HLA-DRB1			
(No. 3)	DRB1*08:01, 13:04	DRB1*08:01, 13:04	DRB1*08:01, 13:04
		DRB1*08:77, 13:04	
(No. 23)	DRB1*09:01, 04:05	DRB1*09:01, 04:05	DRB1*09:01, 04:05
		DRB1*09:21, 04:05	

quantitation ส่วนขั้นตอนการทำ library preparation ใช้เวลาปฏิบัติงานเรียงจากน้อยไปหามากในชุดน้ำยา NGSgo, Holotype HLA และ AllType NGS Assay ตามลำดับ สำหรับระยะเวลาที่ใช้เครื่อง sequencer ชุดน้ำยาทั้ง 3 บริษัทนั้นใกล้เคียงกัน การวิเคราะห์ผลการตรวจอัลลีลต้องนำไฟล์ที่ได้มาวิเคราะห์ผลในคอมพิวเตอร์ โดยชนิดของไฟล์นั้นมีความแตกต่างกันคือ ชุดน้ำยาของ AllType NGS Assay ใช้กับเครื่อง Ion S5 ใช้ BAM file ส่วน NGSgo และ Holotype HLA ใช้กับเครื่อง Miseq จะใช้ FASTQ file โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ผลมีส่วนทำให้ระยะเวลาของการประมวลผลแตกต่างกัน กล่าวคือ โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ผลของชุดน้ำยา Holotype HLA ใช้เวลา 9 ชั่วโมง แต่ชุดน้ำยาของ NGSgo และ AllType NGS Assay ใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลเพียง 3 ชั่วโมง จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า ระยะเวลารวมตั้งแต่ PCR amplification ถึง data analysis ของการใช้ชุดน้ำยาแต่ละบริษัทมีความแตกต่างกัน โดยสามารถเรียงลำดับจากน้อยไปหามากได้ดังนี้ AllType NGS Assay, NGSgo และ Holotype HLA

วิจารณ์

ในประเทศไทย การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคที่ไม่ใช่ญาตินั้น ปัจจัยที่ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสพบผู้บริจาคในการขึ้นทะเบียนค้นหาครั้งแรก ได้แก่ เพศ อายุ หมู่เลือด เชื้อชาติ และกลุ่มโรค malignant diseases นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีผลตรวจอัลลีล HLA ชนิด high resolution ตั้งแต่ขึ้นทะเบียนจะช่วยลดเวลาในการค้นหาผู้บริจาคทำให้ผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายได้เร็วขึ้น[3] ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานในประเทศสวิตเซอร์แลนด์ พบว่าผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนด้วยผล HLA high resolution มีระยะเวลาเฉลี่ยในการพบผู้บริจาคแบบ HLA identical match เร็วกว่าผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนด้วยผล HLA low/intermediate resolution[5] การตรวจอัลลีล HLA ด้วยเทคนิค NGS สามารถระบุความละเอียดในระดับ high resolution เป็น single allele ของแต่ละ locus แบบ 4-6 ตำแหน่ง ได้ผลถูกต้องร้อยละ 98 เมื่อเปรียบเทียบกับผล allele consensus ของ EQC program จากรายงานของ Gandhi และคณะ ที่ทำการตรวจ HLA-A, -B, -C,

-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1 และ -DPB1 ในผู้ป่วยชาวอเมริกันจำนวน 2,532 ราย ได้ผลถูกต้องสูงถึงร้อยละ 99.7 เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค SBT PCR-SSO หรือ SSP[13]

การศึกษาครั้งนี้ ได้ประเมินการตรวจอัลลีล HLA ระดับ high resolution โดยใช้น้ำยาจากบริษัทต่างประเทศ ทำการตรวจตัวอย่างจำนวน 24 ราย ตรวจ HLA 5 loci ประกอบด้วย HLA-A, -B, -C, -DRB1 และ -DQB1 พบว่า ผลการตรวจให้ผลถูกต้องมากกว่าร้อยละ 98 ความผิดพลาดอาจเกิดจากการแปลผลด้วยโปรแกรมอัตโนมัติที่มีข้อจำกัดไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอัลลีล แม้ว่าจะใช้ primer ที่เป็น whole gene แล้วก็ตาม เช่น ผล HLA-A จากน้ำยา Holotype HLA และ ผล HLA-B จากน้ำยา AllType NGS assay โดยต้องนำลำดับเบสที่ตรวจได้ไปเปรียบเทียบผลกับเว็บไซต์ของ IMGT database ซึ่งจำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์ในการแปลผลและสรุปผลการตรวจ ทั้งนี้การสรุปผลของโปรแกรมเกิดจากการนำข้อมูลยีนสายสั้นๆ มาเรียงกันแล้วเทียบกับข้อมูลยีนอ้างอิง (reference HLA allele) จึงมีโอกาสเกิด false positive ได้ เพราะยีนสายสั้นนั้นจะมีโอกาสเหมือนยีนอื่นได้มากกว่ายีนสายยาว จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด phase ambiguity ซึ่งแก้ไขโดยผู้ปฏิบัติงานต้องเข้าไประบุตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องจึงจะสามารถแปลผลได้[9,14] นอกจากนี้ยังพบข้อจำกัดของน้ำยาที่ไม่สามารถสรุปผลของการเกิด ambiguity ได้ เช่น ไม่สามารถแยกผลระหว่าง HLA-DRB1*08:01 กับ HLA-DRB1*08:77 และ HLA-DRB1*09:01 กับ HLA-DRB1*09:21 ซึ่งยีนทั้ง 2 คู่นี้มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ exon 4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yin และคณะ[9] ที่พบปัญหาการเกิด ambiguity ของ HLA-DRB1*04:07 กับ DRB1*04:92 และ DRB1*09:01 กับ DRB1*09:21 ที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ exon 4 และ DRB1*12:01 กับ DRB1*12:10 มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ exon 1 แต่สามารถแก้ปัญหาได้โดยใช้น้ำยาที่สามารถตรวจผล HLA-DRB1 ได้ครอบคลุมตั้งแต่ exon 1 ถึง 6[15] เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการปฏิบัติงานรวมตั้งแต่ PCR amplification ถึงขั้นตอน data analysis น้ำยา NGSgo และ AllType NGS assay ใช้เวลาปฏิบัติงานใกล้เคียงกัน แต่โปรแกรม Type Stream ของน้ำยา AllType NGS assay สามารถวิเคราะห์ผล HLA ทั้ง 11 loci ได้รวดเร็วกว่า มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Van Sandt และคณะ ที่ได้ประเมินน้ำยาของ 4 บริษัท พบว่า ระยะเวลาที่ใช้เรียงตามลำดับมากไปหาน้อยดังนี้ Holotype HLA, NGSgo, Mia Fora และ NXtype[16]

จากที่กล่าวข้างต้นก่อนนำน้ำยามาใช้ในห้องปฏิบัติการ ควรพิจารณาผลการตรวจอัลลีล HLA ขั้นตอนการทำงาน เวลาปฏิบัติงาน ความพร้อมของเครื่องมือและประสบการณ์ของบุคลากร และจำนวนตัวอย่างต่อรอบการตรวจที่เหมาะสม สำหรับการตรวจอัลลีล HLA ด้วยเทคนิค NGS นั้นต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์หลายชนิด จึงต้องมีการฝึกอบรมด้านเทคนิค และเพิ่มประสบการณ์การตรวจอัลลีล HLA อีกทั้งพื้นที่ของห้องปฏิบัติการควรแบ่งเป็นสัดส่วนให้ชัดเจนระหว่าง pre-PCR และ post-PCR เพื่อลดการปนเปื้อนในตัวอย่าง สำหรับห้องที่ติดตั้งเครื่อง sequencer ต้องมีการจัดการระบบอุณหภูมิ ความชื้น ให้เหมาะสมตามคำแนะนำของบริษัท ทั้งนี้จุดคุ้มทุนของการใช้เทคนิค NGS ต้องมีจำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 192 ตัวอย่างต่อ 1 ครั้ง จึงจะมีราคาทุนของการตรวจน้อยกว่าเทคนิค PCR-SSO และ PCR-SSP

สรุป

การศึกษานี้ได้ประเมินชุดน้ำยาของบริษัทต่างประเทศเพื่อตรวจหาอัลลีล HLA ระดับ high resolution ด้วยเทคนิค NGS โดยตรวจจากตัวอย่างควบคุมคุณภาพผลการตรวจที่ได้ถูกต้องมากกว่าร้อยละ 98 แต่มีความแตกต่างกันในเรื่องระยะเวลาของการตรวจขั้นตอนการทดสอบ และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ชุดน้ำยาอาจต้องพิจารณาความเหมาะสมเรื่องต้นทุนน้ำยาและจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. *Krutvecho T. Stem cell donation from donor project. Thai J Hematol Transf Med. 2002;12:3:191-5.*
2. *Phiancharoen S, Kupatawintu P, Nathalang O, Rattajak P, Tatawatorn A, O-Charoen R. Distribution of HLA-A and -B antigens in the National Stem Cell Donor Registry Program. Thai J Hematol Transf Med. 2004;14:171-9.*
3. *Phamorn W, Sanpakit K, Kupatawintu P,Aimyong N. The probability of finding an unrelated donor for stem cell waiting list patients at National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transf Med. 2017;27:127-35.*
4. *Fernandez-Vina MA, Klein JP, Haagenson M, Spellman SR, Anasetti C, Noreen H, et al. Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associated with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 2013;121:4603-10.*

5. *Tiercy JM, Nicoloso G, Passweg J, Schanz U, Seger R, Chalandon Y, et al. The probability of identifying a 10/10 HLA allele-matched unrelated donor is highly predictable. Bone marrow transplantation. 2007;40:515-22.*
6. *Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, et al. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. Blood. 2015;125:1189-97.*
7. *Tupmongkol T, Khanunthong S, Boonpokkrong P, Tatawatorn A, Nathalang O, Attajarusit Y, et al. Implementation of real-time PCR for HLA typing in deceased donors. J Hematol Transf Med. 2017;27:217-24.*
8. *Weimer ET. Clinical validation of NGS technology for HLA: an early adopter's perspective. Hum Immunol. 2016;77:820-3.*
9. *Yin Y, Lan JH, Nguyen D, Valenzuela N, Takemura P, Bolon YT, et al. Application of high-throughput next-generation sequencing for HLA typing on buccal extracted DNA: results from over 10,000 donor recruitment samples. PLoS ONE. 2016;11:e0165810. doi:10.1371/journal.pone.0165810.*
10. *Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Vejbaesya S, Permpikul P. Analysis of HLA typing by next-generation sequencing from proficiency testing data at Siriraj Hospital. J Hematol Transfus Med. 2016;26:191-7.*
11. *Serov YA, Barkhatov IM, Klimov AS, Berkos AS. Current methods and opportunities of next-generation sequencing (NGS) for HLA typing. Cell Ther Transplant. 2016;5:63-70.*
12. *Thorstenson Y, Creary L, Huang H, Rozot V, Wang C, Li M, et al. HLA haplotype diversity in Cape Town, South Africa, Hum Immunol. 2016;77:110.*
13. *Gandhi MJ, Ferriola D, Huang Y, Duke JL, Monos D. Targeted next-generation sequencing for human leukocyte antigen typing in a clinical labolatory. Arch Pathol Lab Med. 2017;141:806-12.*
14. *Larjo A, Eveleigh R, Kilpeläinen E, Kwan T, Pastinen T, Koskela S, et al. Accuracy of programs for the determination of human leukocyte antigen alleles from next-generation sequencing data. Front Immunol. 2017;8:1815.*
15. *Ka S, Lee S, Hong J, Cho Y, Sung J, Kim HN, et al. HLAscan: genotype of the HLA region using next-generation sequencing data. BMC Bioinformatics. 2017;18:258.*
16. *Van Sandt V, Van Miegroet H, Aertgeerts M, Emonds MP. (abstract). Next or Third Gen? What do we need in a clinical setting? a comparison of the most prevalent and newest workflows available using the same sample set. Poster session presented at the 30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI), Kos, Greece; 2016.*