

บทความพิเศษ

Histocompatibility Testing

อ้อยทิพย์ ณ กลาง

ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

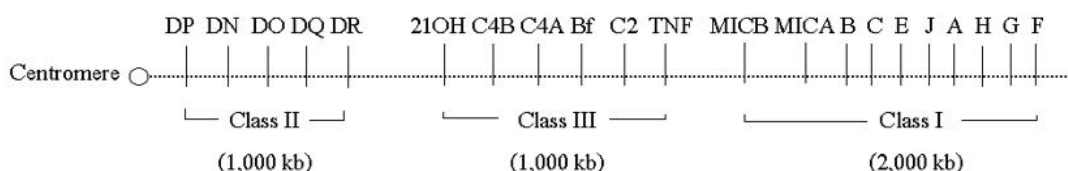
วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบชนิดของยีนและแอนติเจนของระบบ HLA
2. เพื่อให้ทราบวิธีการทดสอบ HLA antigens

Major histocompatibility complex (MHC) คือ บริเวณที่เป็นที่ตั้งของกลุ่มยีนซึ่งเป็นตัวกำหนดและควบคุมลักษณะของแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบรับหรือปฏิเสธเนื้อเยื่อ (tissue rejection) รวมทั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) ระบบของ human leukocyte antigen (HLA) ในคน

region จะประกอบด้วยยีนหลาย locus แต่ละ locus ก็จะมีประกอบด้วยยีนจำนวนมาก¹⁴ ดังแสดงในรูปที่ 1

Class I ประกอบด้วยยีนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ ยีนของ HLA-A, HLA-B และ HLA-C ซึ่งเป็นยีนชนิด classical HLA class I ที่หน้าที่ในการกำหนดการตอบรับหรือปฏิเสธเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังมียีนที่เป็น non-



รูปที่ 1 ลักษณะการเรียงตัวของกลุ่มยีน major histocompatibility complex

นั้นจะถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน HLA ซึ่งอยู่ใน MHC บน short arm ของโครโมโซมคู่ที่ 6 โดยครอบคลุมบริเวณถึง 4 Mb (4,000 kb) ดังรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย 3 regions คือ class I, class II และ class III แต่ละ

classical HLA class I เช่น HLA-E, HLA-F และ HLA-G และยีนที่เป็น classical chain related คือ MICA และ MICB

Class II ประกอบด้วยยีนที่เป็น classical HLA class II คือ HLA-DR, HLA-DP และ HLA-DQ ส่วนยีนที่เป็น non-classical HLA class II คือ HLA-DN และ HLA-DO

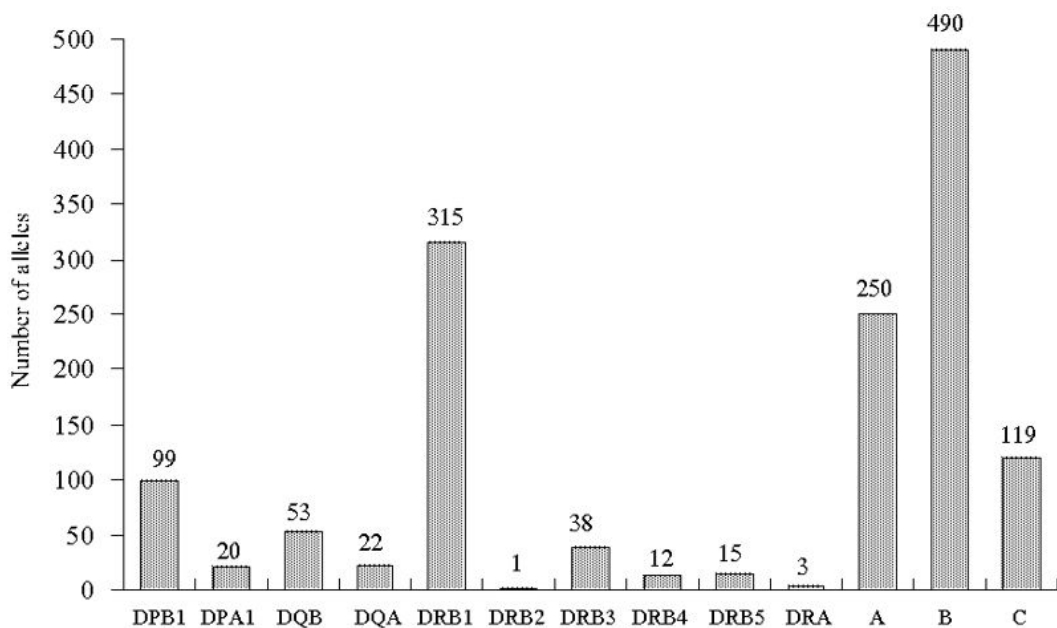
Class III ประกอบด้วยยีนที่สร้างองค์ประกอบของ

ได้รับต้นฉบับ 10 มีนาคม 2547 ให้ลงตีพิมพ์ 11 กรกฎาคม 2547
ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ พ.อ.หญิง อ้อยทิพย์ ณ กลาง
ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถ.ราชวิถี
เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

ระบบ complement คือ Bf, C2, C4A, C4B, tumor necrosis factor (TNF) และ steroid 21-hydroxylase enzymes (21-OH)

Classical HLA genes สำหรับ HLA class I จะควบคุมและกำหนดการสร้างโมเลกุลของโปรตีน HLA-A, HLA-B และ HLA-C ซึ่งจะพบอยู่บนผิวเซลล์ที่มีนิวเคลียสเกือบทุกชนิดในร่างกาย สำหรับ HLA class II คือ HLA-DR, HLA-DP และ HLA-DQ นั้น ยีนในกลุ่มนี้จะประกอบด้วย locus ของ α และ β chain ได้แก่ DRA, DRB, DQA, DQB, DPA, DPB locus เป็นต้น โมเลกุลของโปรตีนของ DR จะถูกควบคุมโดย DRA gene และ DRB gene คือ DRA และ DRB₁ genes (DR1-18), DRA และ DRB3 genes (DR52), DRA และ DRB4 genes (DR53), DRA และ DRB5 genes (DRB51) ส่วน DRB2, DRB6 และ DRB9 เป็น pseudogenes สำหรับโมเลกุลของโปรตีนของ DQ และ DP จะถูกควบคุมโดย DQA₁ และ DQB₁ genes, DPA₁ และ DPB₁ genes แอนติเจนของ HLA class

II จะพบอยู่บนผิวของเซลล์บางชนิด ได้แก่ B lymphocyte, macrophage, dendritic cell และ activated T lymphocyte เป็นต้น เนื่องจากกลุ่มของยีนบน HLA complex จะเรียงอยู่ในบริเวณที่ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นกลุ่มของยีนนี้จะถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปยังลูกไปพร้อมกันทั้งบริเวณ โดยเรียก genetic unit ที่ถ่ายทอดไปด้วยกันบนแต่ละโครโมโซมว่า HLA haplotype ซึ่งจะประกอบด้วย HLA-A, -B, -C และ -D loci สำหรับรูปแบบของยีนที่ต่างกันในแต่ละ locus เรียกว่า allele ซึ่งอาจจะมีรูปแบบเดียว (monomorphic) หรือหลายรูปแบบ (polymorphic) ลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของ HLA gene คือ เป็นยีนที่มี alleles ในแต่ละ locus มากชนิด (highly polymorphic)⁵ ดังแสดงในรูปที่ 2 ในแต่ละคนจึงได้รับการถ่ายทอดแต่ละ haplotype จากพ่อและแม่ โดยทั้ง 2 haplotype จะมี co-dominantly expression คือ มีการแสดงออกของแอนติเจนอย่างเท่าเทียมกัน ลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ เรียกว่า HLA genotype สำหรับ



รูปที่ 2 Extent of polymorphism in HLA (July 2002)

ลักษณะที่แสดงออกจริงเรียกว่า HLA phenotype โดยแต่ละคนจะมี HLA-A, -B, -C อย่างละ 2 โมเลกุล และ HLA-DR, -DP และ DQ อย่างละ 2 โมเลกุลเช่นเดียวกัน

ระบบการเรียกชื่อ HLA

แอนติเจนระบบ HLA เป็น major histocompatibility antigen ซึ่งพบว่าเป็นการปลูกถ่ายอวัยวะ เช่น การปลูกถ่ายไต ถ้าได้ไตมาจากพี่น้องผู้ป่วยที่มีแอนติเจนระบบ HLA เหมือนกัน (HLA identical) จะให้ผล graft survival ดีกว่าไตที่มาจากพี่น้องที่เป็น HLA haploidentical หรือจากผู้บริจาคที่เป็น cadaveric donor⁶ ทำให้มีผู้ทำการศึกษาแอนติเจนระบบนี้อย่างกว้างขวาง และเกิดการสับสนในการเรียกชื่อ บางครั้งแอนติเจนชนิดเดียวกันแต่มีชื่อเรียกแตกต่างกัน เพราะทำการตรวจด้วยวิธีที่แตกต่างกัน เมื่อ ค.ศ. 1964 Terasaki และ Mc Clelland⁷ ได้แนะนำวิธีการตรวจ microlymphocytotoxicity test (LCT) ซึ่งให้ผลไวและแม่นยำกว่าวิธีอื่น และยังคงนิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน ภายหลังจากการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการนานาชาติครั้งแรกในปี 1964 เป็นต้นมา ได้มีการตั้งกรรมการกำหนดชื่อเรียกแอนติเจนของระบบ HLA ด้วยความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก (The HLA Nomenclature Committee) ซึ่งได้มีการกำหนดชื่อของแอนติเจนที่ทำการตรวจทางซีโรโลยี, cellular typing และ molecular typing โดยเริ่มมีอักษรตามหลัง HLA ถ้าเป็น class I ได้แก่ A, B และ C และถ้าเป็น class II ได้แก่ D, DR, DQ และ DP เป็นต้น ส่วน allele ของแต่ละ locus จะได้ชื่อเป็น 1, 2, 3 เป็นต้นไป

เดิมแอนติเจนตัวใดที่ยังต้องการศึกษาเพิ่มเติมจะมี “w” นำหน้าตัวเลขไปก่อน แต่หลังจากการประชุมในปี 1991 ได้มีการนำผลการตรวจซีโรโลยีมาประกอบกับวิธีทาง molecular ในการตั้งชื่อ allele ใหม่ จึงให้ยกเลิก “w” ที่มีนำหน้าตัวเลข ลงเหลือเพียง 3 กรณี คือ Bw4,

Bw6 และ Cw locus ซึ่งยังใช้เป็น Cw เพื่อไม่ให้สับสนกับ complement component รวมทั้งกรณีของ Dw และ DP ซึ่งตรวจด้วยวิธี mixed lymphocyte reaction (MLR) และ primed lymphocyte testing (PLT) การตั้งชื่อทางวิธีซีโรโลยีซึ่งขึ้นต้นด้วย locus ตามด้วยตัวเลข ได้แก่ HLA-A1, HLA-A2, HLA-DR1 เป็นต้น ส่วนวิธีทาง molecular ก็จะตรวจเป็น allele โดยระบบการเรียกชื่อของ HLA จะขึ้นต้นด้วย locus ตามด้วยเครื่องหมายดอกจันและตัวเลข โดยที่ตัวเลข 2 ตัวแรกมักจะตรงกับตัวเลขเดิมที่ทำการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี เช่น HLA-A*0201 วิธีซีโรโลยีคือ HLA-A2 ส่วนตัวเลขหลักที่ 3 และ 4 แสดงถึงลำดับ allele นั้นถูกค้นพบ แต่บางกรณีจะมีตัวเลขลำดับที่ 5 และ 6 เพื่อแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide ที่ไม่ทำให้ amino acid เปลี่ยนแปลง เช่น DRB1*030101 และ DRB1*030102 ที่มีลักษณะโปรตีนเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ระดับ nucleotide 1 ตำแหน่งเท่านั้น ตัวอย่างรายชื่อของ HLA specificities และ HLA alleles ที่ได้รับการตั้งชื่อโดย WHO Nomenclature Committee ในปี 2002⁵ แสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2 สำหรับแอนติเจนที่ตรวจวิธีซีโรโลยี ซึ่งเดิมเคยตั้งชื่อไว้แล้ว แต่ต่อมาสามารถแยกเป็นแอนติเจนย่อยได้อีกหลายชนิดเรียกว่า มี split antigens จึงเขียนชื่อแอนติเจนเดิมไว้ในวงเล็บ เช่น A23 และ A24 เป็น splits ของ A9, B44 และ B45 เป็น splits ของ B12, DR15 และ DR16 เป็น splits ของ DR2 เป็นต้น

การตรวจ HLA antigens

การตรวจหา HLA antigens ทำการทดสอบได้ 2 ระดับ คือ Phenotypic level ซึ่งตรวจชนิดของโปรตีนบนผิวเซลล์โดยใช้วิธีซีโรโลยีหรือวิธี cellular และ Genotypic level ซึ่งจะตรวจ DNA sequence ของยีนนั้นโดยใช้วิธีพีซีอาร์

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ HLA Class I alleles (July 2002)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Serology	Alleles	Serology	Alleles	Serology	Alleles
A1	A*0101-0109	B7	B*0702-0731	Cw1	Cw*0102-0107
A2	A*0201-0258	B8	B*0801-0816	Cw2	Cw*0202-0205
A3	A*0301-0309	B13	B*1301-1310	Cw3	Cw*0302-0315
A11	A*1101-1113	B14	B*1401-1405	Cw4	Cw*0401-0410
A23(9)	A*2301-2309	B15	B*1501-1573	Cw5	Cw*0501-0505
A24(9)	A*2402-2435	B18	B*1801-1818	Cw6	Cw*0602-0607
A25(10)	A*2501-2504	B27	B*2701-2725	Cw7	Cw*0701-0716
A26(10)	A*2501-2618	B35	B*3501-3544	Cw8	Cw*0801-0809
A29(19)	A*2901-2906	B37	B*3701-3705	-	Cw*1202-1208
A30(19)	A*3001-3012	B38(16)	B*3801-3808	-	Cw*1402-1405
A31(19)	A*31012-3108	B39(16)	B*3901-3926	-	Cw*1502-1511
A32(19)	A*3201-3207	B40	B*4001-4044	-	Cw*1601, 1602,
A33(19)	A*3301-3306	B41	B*4101-4105	-	160401
A34(10)	A*3401-3404	B42	B*4201-4204	-	Cw*1701-1703
A36	A*3601-3603	B44(12)	B*4402-4432	-	Cw*1801, 1802
A43	A*4301	B45(12)	B*4501-4506		
A66(10)	A*6601-6604	B46	B*4601,4602		
A68(28)	A*6801-6822	B47	B*4701-4704		
A69(28)	A*6901	B48	B*4801-4807		
A74(19)	A*7401-7408	B49(21)	B*4901-4903		
	A*8001	B50(21)	B*5001-5004		
		B51(5)	B*5101-B5129		
		B52(5)	B*5201-5204		
		B53	B*5301-5309		
		B54(22)	B*5401, 5402		
		B55(22)	B*5501-5512		
		B56(22)	B*5601-5608		
		B57(17)	B*5701-5709		
		B58(17)	B*5801-5806		
		B59	B*5901		
		B67	B*6701, 6702		
		B73	B*7301		
		B78	B*7801-7805		
			B*8201, 8202		
			B*8301		

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ HLA class II alleles (July 2002)

HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Serology	Alleles	Serology	Alleles	Serology	Alleles
	α -Chain		α -Chain		α -Chain
	DRA*0101-010202	-	DQA1*0101-0106	-	DPA1*0103-0108
			DQA1*0201		DPA1*0201-0203
			DQA1*0301-0303		DPA1*0301
			DQA1*0401		DPA1*0401-0402
			DQA1*0501-0505		
			DQA1*0601		
	β -Chain		β -Chain		β -Chain
DR1	DRB1*0101-0108	DQ5(1)	DQB1*0501-0504	DPw1	DPB1*0101
DR15(2)	DRB1*1501-1513	DQ6(1)	DQB1*0601-0620	DPw2	DPB1*0201-0202
DR16(2)	DRB1*1601-1608	DQ2	DQB1*0201-0203	DPw3	DPB1*0301
DR3	DRB1*0301-0323	DQ3	DQB1*0301-0313	DPw4	DPB1*0401-0402
DR4	DRB1*0401-0444	DQ4	DQB1*0401-0402	DPw5	DPB1*0501
DR11(5)	DRB1*1101-1142			DPw6	DPB1*0601
DR12(5)	DRB1*1201-1208				
DR13(6)	DRB1*1301-1312			-	DPB1*0801-4101
	DRB1*1314-1352			-	DPB1*4401-9201
DR14(6)	DRB1*1401-1443				
DR7	DRB1*0701-0706				
DR8	DRB1*0801-0824				
DR9	DRB1*090102,0902				
DR10	DRB1*1001				
	DRB3*0101-0110				
DR52	DRB3*0201-0217				
	DRB3*0301-0303				
DR53	DRB4*0101-0106				
	DRB4*0101-0109				
DR51	DRB5*0101-0109				
	DRB5*0202-0205				

การตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี⁷⁹

วิธี LCT เป็นวิธีที่ยังใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน มีหลักการคือ เมื่อนำเซลล์ lymphocytes ซึ่งมีแอนติเจนของ HLA มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของ HLA ชนิดต่างๆ โดยมีคอมพลีเมนต์ร่วมด้วย เมื่อมีปฏิกิริยาจำเพาะเกิดขึ้น เซลล์ที่เกิดปฏิกิริยาจะตาย อ่านผลโดยการประมาณค่าร้อยละของเซลล์ที่ตาย ซึ่งจะติดสีที่ใช้อยู่คือ Eosin ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี วิธีนี้จำเป็นต้องทำการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง เพราะการแปลการทดสอบต้องเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังมีชีวิตในการทดสอบของ negative control ซึ่งต้องมากกว่า 80% ขึ้นไป ผลการทดสอบนั้นจึงจะเชื่อถือได้ นอกจากนี้สารกันเลือดแข็งที่ใช้ในการเจาะเก็บเลือดควรใช้ acid citrate dextrose (ACD) หรือ sodium heparin ซึ่งไม่มี phenol

สำหรับการตรวจแอนติเจนของ HLA class I คือ HLA-A, -B และ -C อาจใช้ whole lymphocytes หรือ T lymphocytes ก็ได้ แต่หากต้องการตรวจแอนติเจนของ HLA-class II คือ HLA-DR และ -DQ จำเป็นต้องใช้ B lymphocytes ซึ่งสามารถแยกจาก whole lymphocytes ได้หลายวิธี เช่น แยกโดยใช้ nylon wool หรือใช้ monoclonal conjugated magnetic bead หรือใช้วิธี fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated antihuman immunoglobulin antibody¹³⁻¹⁵

การตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี นอกจากจะใช้ในการตรวจแอนติเจนแล้วยังใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีได้ โดยการนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับ panel lymphocytes ของ known HLA specificities ซึ่งอาจจะทำการตรวจกรองกับ panel 30 รายก่อนแล้วจึงตรวจเพิ่มเติมกับ panel อีกประมาณ 60-80 ราย เพื่อจำแนกชนิดของแอนติบอดีนั้น สำหรับการทำ HLA cross-match นั้นก็ยังมีการใช้วิธี LCT ร่วมกับวิธี antiglobulin และ flow cytometry^{14,15}

การตรวจวิธี Cellular^{9,16,17}

วิธี MLR เป็นการตรวจ lymphocyte defined antigen การที่ lymphocytes ที่มี HLA แตกต่างกันเมื่อใส่รวมกันในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง จะเกิดการกระตุ้นซึ่งกันและกัน ทำให้เกิดการสร้างเซลล์อ่อน (blast formation) มีการแบ่งตัวของเซลล์ทำให้เกิด DNA reduplication และสามารถวัดพิกัดของการกระตุ้นได้เมื่อใส่สาร radioactive DNA precursors (³H Thymidine) ลงไปในหลอดทดลองนั้น วิธีนี้เรียกว่า Two-way method เพราะเซลล์ของทั้งสองฝ่ายมีโอกาสไปกระตุ้นและถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวได้ และได้มีการดัดแปลงวิธีการตรวจให้ทำได้สะดวกขึ้น โดย treat เซลล์ฝ่ายหนึ่งด้วย Mitomycin C หรือการฉายรังสีเพื่อไม่ให้เซลล์มีการแบ่งตัวต่อไป แต่ยังสามารถกระตุ้นเซลล์ของอีกฝ่ายหนึ่งได้เรียกว่า stimulator cells เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันจะเกิดการแบ่งตัวเฉพาะเซลล์ที่เรียกว่า responder cells เท่านั้น วิธีนี้เรียกว่า One-way method การตรวจด้วยวิธีนี้ต้องใช้เวลานานถึง 3-6 วัน จึงจะทราบผลและจะบอกได้เพียงว่าเซลล์สองพวกแตกต่างกันเท่านั้นไม่สามารถบอกชนิดได้ กรณีที่ต้องการตรวจชนิดของแอนติเจน D นั้น ต้องทำการทดสอบเซลล์นั้นกับ homozygous typing cells ถ้า responder cells ไม่มีการตอบสนองกับ stimulator cells คือไม่มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์อ่อน ทำให้สามารถบอกความเหมือนหรือแตกต่างของแอนติเจนได้

เดิมการทดสอบ MLR ใช้เพื่อศึกษาความแตกต่างของระบบ major histocompatibility complex ระหว่างผู้บริจาคและผู้รับอวัยวะก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะหรือไขกระดูกในกรณีที่ เป็น living related donor เพราะอาศัยจากการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีอย่างเดียวอาจเกิดความผิดพลาดได้ซึ่งอาจเกิดจาก weak หรือ false negative reaction และปัญหาของ cross reactivity^{18,20} เนื่องจากแอนติซีรัมที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดหนึ่ง

ในขณะเดียวกันสามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดอื่นได้ ทั้งนี้เพราะส่วนโครงสร้างของแอนติเจนบางส่วนคล้ายคลึงกัน ทำให้เกิดปัญหาในการแปลผลผิดพลาดได้ เช่น กลุ่มของ HLA-B27, -B7, -B22 และ -B42 เป็นต้น สำหรับการตรวจหา HLA-D locus นั้นไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีซีโรโลยีได้ ผลการตรวจ MLR จะเป็นตัวช่วยในการพยากรณ์ล่วงหน้าของ graft survival ได้อย่างดี แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการทดสอบใช้เวลานาน และมีขั้นตอนยุ่งยาก ปัจจุบันห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงได้เน้นวิธีทาง molecular มาใช้แทนวิธี MLR ในการตรวจแอนติเจนของ HLA class II

การตรวจด้วยวิธี molecular

การตรวจด้วยวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแอนติเจน HLA ได้หลายระดับ^{21,22} คือ ระดับ low, medium และ high resolution ระดับ low resolution นั้นจะตรวจแอนติเจนได้เป็น broad families of alleles ซึ่งจะเทียบเท่ากับวิธีซีโรโลยี สำหรับระดับ high resolution นั้นจะสามารถจำแนกชนิดของ allele ได้อย่างละเอียดในขณะที่ระดับ medium resolution นั้นผลการทดสอบจะบอกได้เป็นกลุ่มย่อยของ alleles ซึ่งจะช่วยยืนยันและสรุปผลของ low-resolution typing ให้จำกัดในวงแคบลงได้ สำหรับกรณีปลูกถ่ายไตหรือ solid organs อื่นๆ นั้น ส่วนใหญ่ต้องการผลระดับ low-resolution typing เท่านั้น แต่กรณีปลูกถ่ายไขกระดูกหรือปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตนั้นจำเป็นต้องอาศัยการยืนยันผลด้วย high-resolution typing เพื่อช่วยให้มี long-term graft survival และลดปัญหาการเกิด graft-versus-host disease วิธี molecular ที่นิยมใช้ในปัจจุบันจะได้กล่าวต่อไป

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)^{23,24}

วิธีนี้จะนำ genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ re-

striction endonuclease นำมาแยก DNA fragments ใน agarose gel แล้ว transfer ไปยัง nylon membrane เพื่อทดสอบกับ locus-specific probes และแปลผล allele ต่อไป วิธี RFLP นี้ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจกรณีมีตัวอย่างตรวจจำนวนมาก แต่ผลที่ได้บางครั้งจะมีปัญหาในการแปลผล เนื่องจากผลของ cross-hybridization ของแต่ละ locus จึงต้องอาศัยการตรวจ high-resolution เพิ่มเติม ต่อมาได้มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจหา HLA alleles เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของแอนติเจนให้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ได้แก่ PCR-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP), PCR-sequence specific primer (PCR-SSP), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) เป็นต้น

PCR-SSOP^{25,26}

ทำการทดสอบ amplified DNA ของ HLA-class I หรือ class II regions กับ sequence-specific oligonucleotide probes ซึ่งสามารถจะ recognized ความแตกต่างของ HLA alleles ได้ กรณีที่ amplified products เป็น immobilized form เมื่อนำมา hybridized กับ probes ที่ label ด้วย radioactive, enzyme หรือ fluorescent tags ก็จะเกิดปฏิกิริยาเห็นเป็นจุดบนแผ่น filter หรือ membrane ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า dot blot กรณีที่ปฏิกิริยาเห็นเป็นเส้น (line) เรียกว่า slot blot สำหรับกรณีที่ probes เป็น immobilized และ amplified product จะถูก label แทน จะเรียกการทดสอบว่า reverse dot blot หรือ blot dot ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการทดสอบกับตัวอย่างทดสอบจำนวนมากใช้ DNA จำนวนน้อย สามารถตรวจได้ทั้งระดับ low และ medium resolution แต่เนื่องจากแต่ละ sample จะต้องทำปฏิกิริยากับ probes ประมาณ 40-60 ชนิดในแต่ละ

locus จึงต้องมีการ optimized อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา hybridization ให้เหมาะสมเพื่อให้การอ่านผลการทดสอบชัดเจนและถูกต้อง

PCR-SSP^{27,28}

ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวน DNA ของแถบพันธุกรรมของยีนที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ primers ซึ่งมีความจำเพาะกับ single HLA allele หรือ group ของ HLA alleles ชนิดต่างๆ โดยมีหลักการคือ Primers ที่มีลำดับเบสจำเพาะต่ออัลลีล จะสามารถจับกับ DNA template ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ DNA template (PCR product) สามารถตรวจหา allele ได้โดยการวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis หาก DNA template ไม่มี allele ชนิดนั้นคือมีลำดับเบสแตกต่างออกไป ทำให้ primers ไม่สามารถจับกับ DNA template เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ให้ตรวจพบได้ ในการทดสอบด้วยวิธี PCR-SSP นี้จะมี internal control primer pair อยู่ร่วมด้วยเพื่อใช้เป็น control ของการ amplification เมื่อตรวจ amplified products บน agarose gel กรณีที่เกิด bands (ทั้ง specific band ของ HLA allele และ band ของ internal control) แสดงว่าเป็น HLA allele ชนิดนั้น และถ้าพบเฉพาะ internal control band แสดงว่าไม่มี HLA allele ชนิดนั้น การทดสอบด้วยวิธี PCR-SSP สามารถตรวจได้ทั้งระดับ low, medium และ high resolution ขึ้นอยู่กับชนิดของ primers ที่ใช้วิธีนี้ใช้เวลาในการทดสอบหลังจากการเตรียม DNA ประมาณ 2 ชั่วโมง แต่ไม่เหมาะในกรณีที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก

PCR-RFLP^{19,29}

เมื่อได้ amplified products ของกลุ่มของ alleles แต่ละ locus แล้ว นำมาตัดด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease ชนิดต่างๆ เอนไซม์แต่ละชนิดจะสามารถ

ตัด PCR products ได้ตรงตำแหน่ง restriction sites เมื่อเปรียบเทียบ pattern ของปฏิกิริยาที่ได้จากเอนไซม์แต่ละชนิด สามารถจำแนกชนิดของ HLA alleles ได้ วิธีใช้ DNA จำนวนน้อยแต่ไม่เหมาะในการทดสอบในตัวอย่างจำนวนมาก เพราะการทดสอบมีหลายขั้นตอน และต้องระวังการแปลผลผิดในกรณีของ incomplete enzyme digestion

การตรวจด้วยวิธี molecular ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ HLA สำหรับกรณีที่ต้องการตรวจยืนยันผล allele อย่างละเอียดเช่นกรณีของ unrelated stem cell transplantation อาจต้องการตรวจเพิ่มเติมด้วยการใช้ sequence-based typing เพื่อหาลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequencing)³⁰

การตรวจ HLA antigens นั้นเป็นการตรวจซึ่งต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์ทั้งในเรื่องวิธีการทดสอบและการแปลผลการทดสอบ ถึงแม้ว่าจะมีการนำเครื่องมืออัตโนมัติมาช่วยในการทดสอบ เช่น เครื่องหยดเซลล์อัตโนมัติสำหรับการทดสอบทางซีโรโลยี หรือการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยการแปลผลการทดสอบทางซีโรโลยีและวิธีพีซีอาร์ ก็ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีความรู้ความชำนาญมาตรวจสอบเพื่อป้องกันความผิดพลาดในการแปลผล นอกจากนี้เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบ รวมทั้งน้ำยาซึ่งใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่จัดซื้อจากต่างประเทศ อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการจึงควรมีการตรวจสอบคุณภาพของการตรวจ HLA antigens ให้มีมาตรฐานเดียวกัน

สรุป

แอนติเจนของระบบ HLA มีความหลากหลาย ถึงแม้จะมีวิธีการตรวจ HLA antigens ในระดับต่างๆ หลายวิธี การเลือกใช้วิธีในการทดสอบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องพิจารณาให้เหมาะสม สำหรับการปลูกถ่ายไตนั้น ต้องการผลของแอนติเจนในระดับ low resolution ใน

ขณะที่การปลูกถ่ายไขกระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจะต้องมีการตรวจยืนยันด้วย high-resolution typing โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณี unrelated donors

เอกสารอ้างอิง

- Brecher ME, ed. *The HLA system*. In: *Technical manual*. 14th ed. Bethesda, MD: AABB 2003:361-77.
- Harmening DM ed. *The HLA system*. In: *Modern blood banking and transfusion practices*. 4th ed. Thailand: Book Promotion & Service 1999:489-506.
- Margulies DH. *The major histocompatibility complex*. In: *Fundamental Immunology*. Paul WE ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press 1999:263-86.
- ทัศนัยกิจ จันทนียัง. Histocompatibility antigen system. ใน: *เวชศาสตร์การธนาคารเลือด*. กรุงเทพฯ: ธรรมการพิมพ์ 2541: 139-170.
- Marsh SGE, Ekkehard DA, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Eur J Immunogenet* 2002;29:463-515.
- Terasaki PI, Cho Y, Takemoto S, et al. Twenty-year follow-up on the effect of HLA matching on kidney transplant survival and prediction of future twenty-year survival. *Transplant Proc* 1996;28:1144-5.
- Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins *Nature* 1964;204:998-1000.
- Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, et al. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. *Am J Clin Pathol* 1978;69:109-20.
- Macqueen MJ, Tardif G. *Tissue typing reference manual*. 2nd ed. Virginia: South-Eastern Organ Procurement Foundation, 1987.
- Eisen SA, Wedner HJ, Parker CW. Isolation of pure human peripheral blood T lymphocytes using nylon wool column. *Immunol Commun* 1972;1:571.
- Werner C, Klouda PT, Correa MC, Vassali P, Jeannet M. Isolation of B and T lymphocytes by nylon fibre columns. *Tissue Antigens* 1977;9:227-9.
- Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 1986;28:301-12.
- Gratama JW, Schuurman RK, van Leeuwen A, et al. Comparison of complement-dependent cytotoxicity and indirect immunofluorescence of enumeration of T-cell subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol Methods* 1983;64:99-108.
- Harmer AW, Garner S, Bell AE, et al. Evaluation of the flow cytometric crossmatch, Preliminary results of a multicentre study. *Transplantation* 2000;61:1108-11.
- Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, et al. Long-term graft survival is improved in a cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 2000;66:1827-32.
- Bain B, Lowenstein L. Genetic studies on the mixed lymphocyte reaction. *Science NY* 1964;145:1315-6.
- Bach FH, Voynow NK. One way stimulation in mixed leukocyte culture. *Science NY* 1966;153:545-7.
- Duquesnoy RJ, Marrari M. Progress report on the ASHI/CAP proficiency survey program in histocompatibility testing. HLA-DR, -DQ serologic typing, antibody indentification, and B-cell crossmatching. *Hum Immunol* 1994;39:96-105.
- Na Thalang, Sukha C, Suwanasophon C, Maneemaroj, Okubo Y, Tatsumi N. Analysis of HLA-DRB₁ alleles using PCR-RFLP and PCR-MPH. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996;27:169-71.
- Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors and increased resolution compared to serological typing. *Tissue Antigens* 2001;58:299-307.
- Gerlach JA. Human lymphocyte antigen molecular typing: how to identify the 1250+ alleles out there. *Arch Path Lab Med* 2001;126:281-4.
- Chee RE. Histocompatibility testing. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002;33(suppl 2):112-4.
- Duquesnoy RJ, Trucco M. Genetic basis of cell surface polymorphisms encoded by the major histocompatibility complex in humans. *Crit Rev Immunol* 1988;8:103-45.
- Bidwell JL, Bidwell EA, Wood DAP, et al. HLA-DR and -DQ typing by DNA-RFLP analysis. In: Hui KM, Bidwell JL, eds. *Handbook of HLA typing techniques*.

- Florida: CRC Press Inc 1993:71-98.
25. Wordworths P. Techniques used to define human MHC antigens: polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Immunol Lett* 1991;29:37-9.
 26. Suberville-Boissel C, Chapuis E, Charron D, Raffoux C. Comparative study of two methods of HLA-DR typing: serology and PCR/dot blot reverse. *Transplant Proc* 1997;29:2335-6.
 27. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35.
 28. Olerup O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification. *Tissue Antigens* 1994;43:253-6.
 29. Inoko H. PCR-RFLP method holds great promise for complete HLA class II genotyping. *Tissue Antigens* 1990;36:88-92.
 30. Ross J. Sequencing-based typing. In: *Histocompatibility testing*. Bidwell JJ, Navaratte C, eds. Singapore: Imperial College Press 2000:213-46.

CME Credit

จงเลือกข้อที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อเดียวลงในแบบส่งคำตอบ CME Credit ท้ายเล่ม

1. The HLA genes are located on chromosome number:
 - A. 2
 - B. 4
 - C. 6
 - D. 8
 - E. 10
2. DR51 molecules are the product of:
 - A. *DRA* and *DRB1*
 - B. *DRA* and *DRB2*
 - C. *DRA* and *DRB3*
 - D. *DRA* and *DRB4*
 - E. *DRA* and *DRB5*
3. The test of choice for HLA antigen testing, in which known sera are tested to type HLA antigens on test cells is:
 - A. Inhibition
 - B. Agglutination
 - C. Cytotoxicity
 - D. Fluorescent antibody test
 - E. Enzyme-linked immunosorbent test
4. Test which is used for HLA-D typing is:
 - A. Flow cytometry
 - B. Mixed lymphocyte reaction
 - C. Primed lymphocyte test
 - D. Fluorescent antibody test
 - E. Enzyme-linked immunosorbent test
5. Molecular typing which is usually employed for high throughput is:
 - A. PCR-SSOP
 - B. PCR-SSP
 - C. PCR-RFLP
 - D. PCR-SSCP
 - E. Sequence-based typing

ศติธรรมนำกำจัตจุตถ่น

คนพาลไมให้ทานเพราะกลัวจน

บัณฑิตชนกลัวจนจึงให้ทาน

พระครูปริยัติปัญญาวุฒ

วัดโศภนาราม อ.ด่านซ้าย จ.เลย