

นิพนธ์ต้นฉบับ

การนำวิธี Real-time PCR มาใช้สำหรับการตรวจชนิดเอชแอลเอ ในผู้บริจาคอวัยวะสมองตาย

ธมลวรรณ ทักษิณ¹ ศรีประไพ ชนุนทอง² พชรินทร์ บุญปกครอง² อารยา ตัณฑะ² อ้อยทิพย์ ณ ถลาง³
ยุวดี อรรถจารุสิทธิ์¹ และ วิศิษฐ์ ลีตวัฒน์¹

¹ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย ²ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ³บัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

ความเป็นมา การตรวจหาแอนติเจนเม็ดโลหิตขาว (human leukocyte antigen, HLA) ในผู้บริจาคไตสมองตายนิยมใช้วิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เช่น PCR-sequence specific primers (PCR-SSP) ซึ่งมีขั้นตอนและใช้เวลาในการเตรียม น้ำยา และอุปกรณ์ในขั้นตอนหลังปฏิกิริยา PCR (post PCR) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ในการ ทดสอบ HLA typing ซึ่งมีข้อดีคือ ได้ผลการตรวจวิเคราะห์รวดเร็วกว่าวิธี conventional PCR **วัตถุประสงค์** เพื่อประเมินการ ทดสอบ commercial real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตาย **วัสดุและวิธีการ** ใช้ตัวอย่างจำนวน 47 รายที่ได้จากการทดสอบความชำนาญซึ่งทราบผลการตรวจอัลลีล HLA แต่ละ locus ด้วยวิธี PCR-SSP, PCR-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSO) และ/หรือ sequence-based typing (SBT) เปรียบเทียบกับผลการตรวจ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DOB1 และ HLA-DPB1 ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา **ผลการศึกษา** จากการ เปรียบเทียบผล HLA typing พบว่า ผล HLA typing ทั้ง HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DOB1 และ -DPB1 ด้วยวิธี real-time PCR กับ PCR-SSP, PCR-SSO และ/หรือ SBT มีความสอดคล้องกันร้อยละ 97.9 โดยพบปัญหาการแยกชนิดระหว่าง HLA-B*15:02 และ HLA-B*15:25 ใน 1 ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR-SSO พบว่าเป็น B*15:02 ซึ่งตรงกับวิธี PCR-SSP แต่ วิธี real-time PCR ใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่าวิธี PCR-SSP ถึง 2 เท่า และขั้นตอนการแปลผลใช้โปรแกรมสำเร็จรูปจึงสะดวกใน การสรุปผล **สรุป** การศึกษานี้ได้ตรวจอัลลีล HLA ด้วยวิธี real-time PCR ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีพีซีอาร์ชนิดอื่น สามารถ รายงานผลการตรวจได้ถูกต้อง แม่นยำ แต่อาจมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกอัลลีลของ HLA-B*15 บางชนิด ดังนั้นการใช้วิธี real-time PCR จะช่วยลดขั้นตอน และเวลาในการทดสอบจึงประยุกต์ใช้กับการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตายได้ต่อไป

คำสำคัญ : ● HLA ● Real-time PCR ● Deceased donors ● Kidney transplant

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2560;27:217-24.

ได้รับต้นฉบับ 22 มิถุนายน 2560 รับลงตีพิมพ์ 11 สิงหาคม 2560

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ศ.พิเศษ พลตรีหญิง ดร. อ้อยทิพย์ ณ ถลาง บัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 E-mail: oytipntl@hotmail.com

Original Article

Implementation of Real-time PCR for HLA Typing in Deceased Donors

Tamonwan Tupmongkol¹, Sriprapai Khanunthong², Patcharin Boonpokkrong², Araya Tatawatorn²,

Oytip Nathalang³, Yuwadee Attajarusit¹ and Visit Dhitivat¹

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

Abstract:

Background: The polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) is currently used to type human leukocyte antigen (HLA) in deceased donors. This technique requires multiple steps and is time consuming due to post PCR process. Currently, the real-time PCR technique which has faster turn-around time has been applied for HLA typing. **Objective:** To evaluate the use of commercial real-time PCR assay for HLA typing in deceased donors. **Materials and Methods:** Altogether, 47 samples from proficiency testing that had previously been HLA typed for each locus by PCR-SSP, PCR-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSO) and/or sequence-based typing (SBT) techniques were included. Previous HLA results (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1 and -DPB1) were compared with real-time PCR assay by descriptive statistics. **Results:** The comparison of HLA typing results (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1 and -DPB1) from real-time PCR versus PCR-SSP, PCR-SSO and/or SBT showed 97.9% concordance. The inability to differentiate between HLA-B*15:02 (75) and HLA-B*15:25 (62) by real-time PCR assay was detected in one example and the confirmation result by PCR-SSO was B*15:02, identical to the PCR-SSP result. Interestingly, test time of the real-time PCR was 2 times less than PCR-SSP. The software program was used to analyze HLA typing results. **Conclusion:** HLA typing using real-time PCR could provide accurate results compared with other PCR techniques. The limitation of differential detection in some HLA-B*15 was found. Therefore, the real-time PCR for HLA typing could provide less test steps and time consuming, which can be implemented in deceased kidney donor typing.

Keywords : ● HLA ● Real-time PCR ● Deceased donors ● Kidney transplant

J Hematol Transfus Med 2017;27:217-24.

บทนำ

ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้ร่วมกันดำเนินการจัดสรรไตจากผู้บริจาคสมองตาย (deceased donors) ให้กับผู้ป่วยที่รอรับการปลูกถ่ายไต โดยใช้เกณฑ์การจัดสรรไตดังนี้คือ ผู้ป่วยที่ได้รับการคัดเลือกให้เข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายไตได้ (crossmatch) กับผู้บริจาค โดยผู้บริจาคไตต้องมีหมู่โลหิต ABO ที่ตรงกัน หรือเข้ากันได้กับผู้รับ ผู้ป่วยที่มีคะแนนรวมสูงสุดของคะแนนจาก human leukocyte antigen (HLA) mismatch (MM), HLA antibody (panel reactive antibody; PRA), ระยะเวลาการรอรับไต (waiting time) และอายุผู้ป่วย ซึ่งผู้ป่วยที่มีผล HLA crossmatching เป็นผลลบเท่านั้น จึงจะได้รับการปลูกถ่ายไต¹

เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีจำกัด เพราะการปลูกถ่ายไตหลังจากที่ไตถูกผ่าตัดออกจากผู้บริจาคอวัยวะ หากนานกว่า 24 ชั่วโมง จะส่งผลต่อการทำงานของไตที่นำไปปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วย สำหรับการตรวจ HLA-A, -B และ -DR typing ในผู้บริจาคไตนั้น ระยะแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2550 ห้องปฏิบัติการของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ทำการตรวจ HLA typing ด้วยวิธีซีโรโลยี ซึ่งต้องใช้โลหิตที่เจาะใหม่ที่มีปริมาณเพียงพอ อีกทั้งมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน และต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานด้านการอ่านผลและแปลผลการตรวจ ต่อมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 จึงได้เปลี่ยนวิธีการตรวจ HLA typing เป็นวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เช่น PCR with sequence-specific primer (PCR-SSP), PCR-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) ซึ่งพบว่า ช่วยลดเวลาการทดสอบ การวิเคราะห์ผลเพราะใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการแปลผล และใช้ตัวอย่างโลหิตน้อยกว่าวิธีซีโรโลยี²⁻⁴

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจ HLA typing ด้วยวิธีพีซีอาร์ ที่ช่วยลดขั้นตอนการอ่านผลโดยไม่ต้องใช้วิธีการ gel electrophoresis ทำให้ลดเวลาของการทดสอบได้ เช่น วิธี real-time PCR ซึ่งมีรายงานการประยุกต์ใช้ในการตรวจ HLA typing ในการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล HLA กับการเกิดโรคบางชนิด เช่น HLA-B*27 กับ rheumatoid arthritis และ HLA-B*51 กับโรคเบเซท (Behcet's disease) ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล HLA กับการแพ้ยาบางชนิด เช่น HLA-B*57:01, HLA-B*15:02, HLA*58:01 เป็นต้น พบว่า ผลการตรวจอัลลีล HLA ด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลการตรวจถูกต้องแม่นยำ สอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น PCR-SSP, PCR-SSO และ sequence-based typing⁵⁻⁹

ต่อมามีรายงานการประยุกต์ใช้วิธี real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตาย โดยเปรียบเทียบผลการตรวจอัลลีล HLA กับวิธี PCR-SSP พบว่า ผลการตรวจในผู้บริจาคไตจำนวน 210 ราย ให้ผลสอดคล้องกัน 100% ข้อดีของวิธี real-time PCR คือ ลดเวลาในการตรวจเหลือเพียง 2 ชั่วโมง ในขณะที่วิธี PCR-SSP ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง และผู้ปฏิบัติงานไม่มีความเสี่ยงกับการสัมผัสกับสารก่อมะเร็ง เช่น ethidium bromide ที่ใช้ในการย้อมเจลในขั้นตอน gel electrophoresis¹⁰ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้วิธี real-time PCR สำหรับการประยุกต์ใช้ในการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตายในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผลการตรวจ HLA ด้วยวิธี PCR-SSP (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) หรือ PCR-SSO (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) หรือ sequence-based typing (SBT) จำนวนทั้งหมด 47 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างจากการเข้าร่วมโครงการ Proficiency Testing เพื่อการจัดสรรอวัยวะ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะจำนวน 32 ราย และตัวอย่างจากการเข้าร่วมโครงการทดสอบความชำนาญสำหรับการตรวจ HLA ของ The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) และ Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association (APHIA) จำนวน 15 ราย ทั้งนี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างโดยพิจารณาตามผลการตรวจของอัลลีล HLA แต่ละ locus รายละเอียดดังแสดงใน Table 1

วิธีการศึกษา

นำตัวอย่างทั้ง 47 รายมาทำการทดสอบหาอัลลีลของ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, และ -DPB1 ด้วยชุดน้ำยา LinkSeq™ HLA-ABCD RDQDP+384, Lot no. K3197 (Linkage Biosciences Inc., San Francisco, CA, USA) ในชุดน้ำยาประกอบด้วย PCR trays 384 หลุม ซึ่งบรรจุ sequence specific primers ที่จำเพาะต่ออัลลีล HLA ในรูปแบบแห้ง, LS buffer และ DNA polymerase สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA และ PCR Optical Tray Seals สำหรับปิด tray เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยา ขั้นตอนการทดสอบปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน และข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ส่วนผสมของ PCR reaction mixture ปริมาตรรวมเท่ากับ 2,400 µL โดยใช้ DNA Taq polymerase ปริมาตร 92 µL รวมกับสัดส่วน

Table 1 HLA typing results of 47 known DNA samples

Group	HLA							No. tested
	A	B	C	DRB1	DRB3/4/5	DQB1	DPB1	
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	15
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓		5
3	✓	✓	✓	✓		✓		3
4	✓	✓	✓	✓				6
5	✓	✓		✓	✓	✓		18
Total	47	47	29	47	38	41	15	47

ปริมาณของ DNA และน้ำ ซึ่งคำนวณจากสูตร $3,700 \text{ ng} \div$ ความเข้มข้นของ DNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$) จะเท่ากับปริมาณของ DNA ที่ใช้ทดสอบ และปริมาณของน้ำกลั่นคำนวณจาก $2,308 \mu\text{L}$ หักลบจากปริมาณ DNA ที่คำนวณได้ หลังจากนั้นเติมส่วนผสมของ PCR reaction mixture ลงในหลอด LS buffer แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเติมส่วนผสมลงใน PCR tray 384 หลุมๆละ $10 \mu\text{L}$ ปิด PCR trays ด้วย tray seal จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง real-time PCR รุ่น LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ และตั้งค่า condition ดังนี้ ขั้นแรก denaturation 95°C . เป็นเวลา 120 วินาที จำนวน 1 cycle และขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 95°C . เป็นเวลา 15 วินาที อุณหภูมิ 64°C . เป็นเวลา 60 วินาที จำนวน 36 cycles หลังจากปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดเป็นการทำ melting curve analysis ที่อุณหภูมิ 95°C . เป็นเวลา 5 วินาที และลดอุณหภูมิมาที่ 65°C . เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิ 97°C . โดยระหว่างที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น เครื่องจะวิเคราะห์ค่าการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ขณะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิไป 1°C . และแสดงค่าเป็น melting curve ของ primers

ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีลของ HLA แต่ละ locus ส่วนการแปลผลการตรวจใช้โปรแกรม SureTyper™ (Linkage Biosciences Inc., San Francisco, CA, USA) (Figure 1) โดยโปรแกรมทำการวิเคราะห์ผลจาก melting curve ของ primer ในแต่ละหลุม กรณีที่ให้ผลบวกจะพบ peak ที่ช่วงอุณหภูมิ melting temperature ของแต่ละ primer (Figure 1A) ส่วนกรณีที่ไม่ให้ผลบวกจะพบ peak ที่ช่วงอุณหภูมิ melting temperature ของ internal control เท่านั้น (Figure 1B) และใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการสรุปผลการตรวจอัลลีล HLA โดย HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5 และ -DQB1 สรุปผลในระดับ low resolution (generic, allele 2 digit) และ HLA-DPB1 สรุปผลในระดับ high resolution (allele 4 digit, P group) (Figure 1C)

หลังจากนั้นเปรียบเทียบผลการตรวจอัลลีล HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5 และ -DQB1 ในระดับ low resolution และ HLA-DPB1 ในระดับ high resolution จากการทดสอบตัวอย่าง DNA ทั้ง 47 ราย ที่ได้จากวิธี real-time PCR กับผลการตรวจที่ได้จากวิธี PCR-SSP, PCR-SSO และ/หรือ SBT

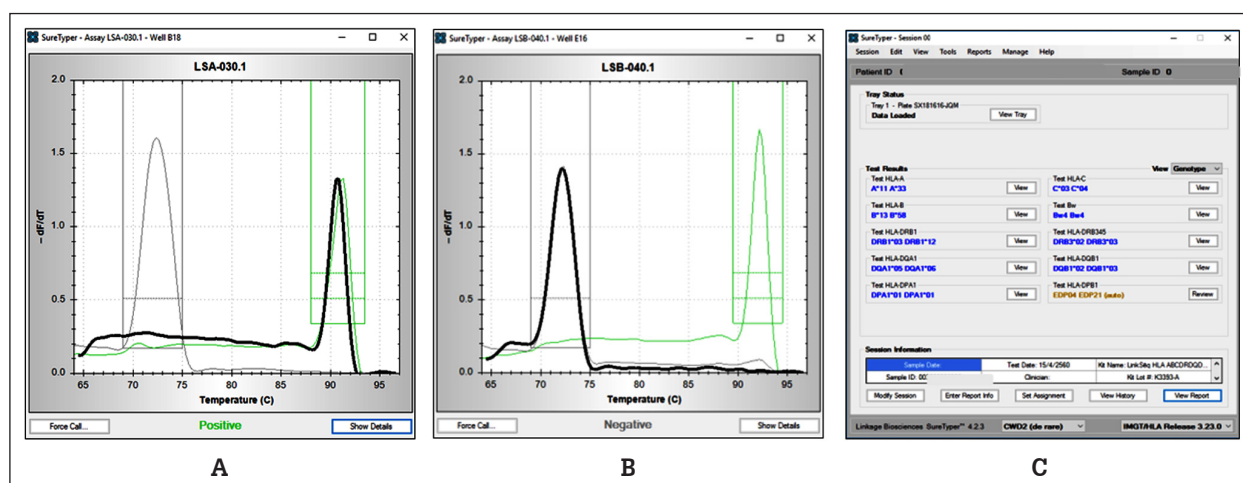


Figure 1 An example of melting temperature profile using SureTyper™ program for LinkSeq™ HLA-ABCDRDQDP+384 analysis. The melting peaks of positive (A) and negative (B) results. (C) Generic assignment of the HLA results.

ผลการศึกษา

จากการตรวจอัลลีลของ HLA ในตำแหน่ง HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DOB1 และ -DPB1 ด้วยวิธี real-time PCR ในตัวอย่างจำนวน 47 ราย เมื่อวิเคราะห์ความครอบคลุมชนิดของแอนติเจนในแต่ละ locus พบว่า แอนติเจนของ HLA-A; -B ที่ไม่ได้ตรวจคือ A*25, A*36, A*66 และ A*69; B*42, B*47, B*59, B*67, B*15 (B70) และ B*73 ซึ่งเป็นกลุ่มแอนติเจนที่พบได้น้อยทุกกลุ่มประชากร¹ ส่วนอัลลีลของ HLA-DRB และ HLA-DOB1 นั้นได้ตรวจครอบคลุมทุกอัลลีล (Table 2)

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจอัลลีลของ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DOB1, และ -DPB1 ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR กับผลการตรวจของตัวอย่างที่ได้ตรวจไว้ด้วยวิธี PCR-SSP, PCR-SSO และ/หรือ SBT ซึ่งประกอบด้วยผลในระดับ low resolution, intermediate resolution และ/หรือ high resolution จำนวน 47 รายพบว่า ผลการตรวจอัลลีล HLA ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ของ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5 และ -DOB1 สามารถบอกผลอัลลีลได้ในระดับ low resolution และ HLA-DPB1 สามารถบอกผลอัลลีลได้ในระดับ high resolution และให้ผลการตรวจตรงกันกับวิธีที่ตรวจไว้เดิมจำนวน 46 ราย มีความสอดคล้องกันร้อยละ 97.9 แต่มีผลการตรวจในตัวอย่างตรวจหมายเลข 37 ที่เดิมมีผลการตรวจเป็น HLA-A*02, 26; B*15(62), 40(60); DRB1*04, 15; DRB4*, DRB*5; DOB1*03(8), 05 ผลการตรวจอัลลีลของ HLA-A, -DRB และ -DOB1 ที่ได้จากวิธี real-time PCR ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจเดิม ยกเว้นผลของ HLA-B ซึ่งผลการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น B*15:02 หรือ B*15:25 ซึ่งทั้งสองอัลลีลเมื่อแปลผลทางซีโรโลยีจะเป็น B75 หรือ B62 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี PCR-SSO พบว่าให้ผลการตรวจเป็น B*15:02 โดยการตรวจ HLA typing ด้วยวิธี real-time PCR ใช้เวลาในการตรวจรวม 1 ชั่วโมง 30 นาที ต่อหนึ่งราย ซึ่งเร็วกว่าวิธีเดิม (PCR-SSP) อยู่ 1 ชั่วโมง 30 นาที

วิจารณ์

ตามเกณฑ์การจัดสรรไตจากผู้บริจาคไตสมองตายของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย จะพิจารณาผล HLA matching ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคไต โดยพิจารณาจากผลการตรวจ HLA 3 ตำแหน่งคือ HLA-A, -B และ -DRB1 ในระดับซีโรโลยีให้มีความเหมือนกันมากที่สุด¹ การตรวจ HLA typing ในกรณีของผู้ป่วย สามารถเลือกใช้วิธีการตรวจได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ ส่วนการตรวจ HLA

typing ในกรณีของผู้บริจาคไตสมองตาย เนื่องจากมีเวลาจำกัด เพราะต้องนำผลการตรวจหมู่เลือด ABO และ HLA-A, -B และ -DRB1 typing ที่ได้มากรอกข้อมูลเข้าระบบคอมพิวเตอร์ของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย เพื่อใช้ในการเลือกผู้ป่วยที่มีคะแนนรวมสูงสุด และนำซีรัมผู้ป่วยมาตรวจ HLA crossmatching ต่อไป การพิจารณาวิธีการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตายที่เหมาะสมต้องคำนึงถึง ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ และเวลาที่ใช้ในการทดสอบ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้วิธีตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตายด้วยวิธีพีซีอาร์ซึ่งอาจใช้วิธี PCR-SSP เพราะให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ แต่การทดสอบมีหลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลาในการทดสอบต่อรายประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยมีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis หากมีเทคนิคที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ จะทำให้ขั้นตอนและระยะเวลาในการปฏิบัติงานลดลง ซึ่งเทคนิคการตรวจ HLA typing ได้มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นหลายวิธี โดยการศึกษาครั้งนี้ทางห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งทำหน้าที่ในการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตาย จึงได้พิจารณานำเทคนิคการตรวจด้วยวิธี real-time PCR มาใช้ เนื่องจากมีรายงานการตรวจ HLA typing ของทั้ง HLA-A, -B และ -DR ในผู้บริจาคไตสมองตายที่พบว่าผลการตรวจสอดคล้องกับวิธีพีซีอาร์ชนิดอื่น โดยใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่า¹⁰ ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า การตรวจ HLA typing แต่ละรายใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง 30 นาทีเท่านั้นซึ่งน้อยกว่าวิธี PCR-SSP ถึง 2 เท่า

นอกจากนี้เมื่อคำนวณเปรียบเทียบต้นทุนรายของการตรวจ HLA typing แต่ละ locus วิธี real-time PCR สามารถตรวจอัลลีลของ HLA-A, -B, -C, -DRB, -DOB1 และ -DPB1 โดยมีราคาต้นทุนประมาณ 9,800 บาท ขณะที่ราคาของวิธี PCR-SSP ที่ตรวจได้ครบทุกตำแหน่งที่กล่าวข้างต้นจะมีต้นทุนประมาณ 13,000 บาท ถึงแม้ว่าในปัจจุบันการพิจารณา HLA matching ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคไตสมองตายจะพิจารณาจาก HLA-A, -B และ -DRB1 เท่านั้น แต่ในกรณีที่ผู้ป่วยมีปัญหาเรื่อง graft rejection ข้อมูลเกี่ยวกับความแตกต่างของอัลลีล HLA-C และ -DPB1 อาจช่วยในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงมีประโยชน์ต่อการระบุแอนติบอดีของผู้ป่วยต่อแอนติเจนของผู้บริจาคด้วย^{11,12} สำหรับกรณีผลการตรวจเปรียบเทียบระหว่างวิธี real-time PCR กับการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ชนิดอื่น พบว่าให้ผลสอดคล้องร้อยละ 97.9 และพบปัญหาเรื่องการแปลผลของ HLA-B*15 ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบได้น้อยในคนไทย¹³ ดังนั้นชุดน้ำยาตรวจจะต้องพิจารณาเลือก primers ที่แยกระหว่าง HLA-B*15:02 กับ HLA-B*15:25 ได้ ซึ่งกรณีนี้หากรายงานผลผิดพลาดจะส่งผลต่อการ

Table 2 HLA genotyping results for sample number 1 to 47 by PCR-SSO/SSP/ST techniques

Group	Sample	PCR-SSO/SSP/SEBT													
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*		HLA-DRB1*	HLA-DRB3/4/5*	HLA-DOB1*	HLA-DPB1*						
1	1	23:01	29:02	53:01	81:01	06:02	18:01	08:04	13:02	3*03:01	04:02	06:04	03:01P	07:01P	
	2	02:02	23:01	15:16	44:10	04:01	14:02	07:01	15:03	4*01:01	5*01:01	06:02	11:01P	03:01P	
	3	02:01	68:02	08:01	55:01	03:03	03:04	08:01	13:04	3*02:02	03:19	04:02	01:01P	04:01P	
	4	74:01	-	35:01	53:01	04:01	16:01	01:02	11:01	3*02:02	03:19	05:01	13:01P	07:01P	
	5	01:01	26:01	07:02	08:01	03:04	07:02	13:04	15:01	3*02:02	5*01:01	06:02	04:01P	03:01P	
	6	02:02	23:01	15:16	44:10	04:01	14:02	07:01	15:03	4*01:01	5*01:01	06:02	03:01P	01:01P	
	7	24:02	68:01	40:01	44:02	03:04	16:04	04:04	11:04	3*02:02	4*01:03	03:02	04:02P	-	
	8	01:01	03:01	08:01	18:01	06:02	07:01	11:01	11:04	3*02:02	03:01	-	04:01P	04:02P	
	9	29:02	33:03	15:31	45:01	04:27	16:01	04:01	15:03	4*01:03	5*01:01	06:02	04:01P	01:01P	
	10	02:02	33:03	50:01	53:01	04:01	06:02	08:04	16:02	5*02:02	03:19	05:02	01:01P	04:01P	
	11	02:01	24:02	08:01	40:01	03:04	07:02	07:01	13:02	3*02:02	3*03:01	02:01	06:04	02:01	03:01
	12	02:01	23:01	49:01	57:01	06:02	07:01	07:01	11:04	3*02:02	4*01:03N	03:01	03:03	04:01	23:01
	13	24:02	31:01	51:02	54:01	01:02	15:02	04:05	12:02	3*03:01	4*01:03	03:01	04:01	03:01	14:01
	14	01:01	29:02	57:01	58:01	06:02	07:01	07:01	08:04	4*01:03N	03:03	04:02	04:01	13:01	13:01
	15	03:01	29:01	07:02	07:05	07:02	15:05	01:01	07:01	07:01	4*01:01	02:02	05:01	04:01	17:01
2	16	11	-	15(75)	27	03(10)	08	11	12	3	03(7)	-			
	17	24	26	27	40(61)	15	15	11	15	3	03(7)	06			
	18	02	33	40(60)	40(61)	03(10)	15	04	13	3	03(7)	03(8)			
	19	11	26	40(60)	40(61)	03(10)	04	09	16	4	03(9)	05			
	20	11	68	27	51	12	15	07	12	3	02	03(7)			
3	21	02:01	24:02	18:01	38:02	07:01	07:02	15:02	-	05:01	-				
	22	11	-	13	46	01	03(10)	09	15	03(9)	06				
	23	02	11	18	46	01	07	09	15	03(9)	05				

Table 2 HLA genotyping results for sample number 1 to 47 by PCR-SSO/SSP/SSP/SSP techniques (cont.)

Group	Sample	PCR-SSO/SSP/SSP									
		HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	HLA-DRB1*	HLA-DRB3/4/5*	HLA-DOB1*	HLA-DPB1*			
4	24	11	32	14(65)	15(62)	04	08	01	15		
	25	02	11	15(76)	15(62)	04	-	15	16		
	26	02	11	15(62)	40(60)	04	07	09	16		
	27	11	-	15(62)	15(75)	04	08	04	12		
	28	02	11	15(77)	54	01	08	07	13		
	29	01	11	15(75)	15(63)	07	08	04	13		
	30	02	24	40(60)	46			09	15	4	5
	31	02	-	46	-			09	12	3	4
	32	11	24	15(75)	-			12	-	3	03(7)
5	33	02	-	40(60)	46			09	16	4	5
	34	34	68	39	56			04	11	3	4
	35	24	74	18	-			04	9	4	03(8)
	36	11	-	39	-			04	-	4	04
	37	02	26	15(62)	60			04	15	4	5
	38	11	33	56	58			03	11	3	03(7)
	39	02	24	40(61)	55			12	15	3	5
	40	11	24	15(75)	52			15	16	5	05
	41	02	24	15(75)	38			15	-	5	05
	42	01	02	15(63)	51			13	14	3	05
	43	11	-	13	-			09	15	4	5
	44	30	68	35	44			07	11	3	4
	45	24	33	15(62)	15(62)			15	-	5	05
	46	11	24	15(75)	48			04	09	4	03(8)
	47	30	32	13	37			10	-		05

คัดเลือกผู้ป่วยตามเกณฑ์การจัดสรรไต¹⁴ ดังนั้นบริษัทผู้ผลิตน้ำยาสำหรับการตรวจ HLA typing ต้องพิจารณาปรับปรุงชุดน้ำยาให้เหมาะสมต่อการตรวจในกลุ่มประชากรที่มีความถี่ของ HLA-B*15 สูงกว่ากลุ่มประชากรอื่น และทางห้องปฏิบัติการควรมีเทคนิคการตรวจหรือน้ำยาชนิดอื่นเพื่อใช้เป็นวิธีการตรวจสอบหาพบข้อจำกัดของน้ำยาที่ไม่สามารถตรวจแยกอัลลีลบางชนิดได้

สรุป

การตรวจอัลลีล HLA ทั้ง HLA-A, -B, -C, -DRB, -DQB1, และ -DPB1 ด้วยวิธี real-time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจที่ได้กับการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ชนิดอื่น สามารถตรวจได้ถูกต้อง แม่นยำ แต่อาจมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกอัลลีลของ HLA-B*15 บางชนิดที่พบบ่อยในคนไทย อย่างไรก็ตามการใช้วิธี real-time PCR นอกจากจะช่วยลดขั้นตอน และเวลาในการทดสอบแล้วยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจ HLA typing ในผู้บริจาคไตสมองตายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเมดิคอลฮิตทาว และเกล็ดโลหิต ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ช่วยรวบรวมข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kupatawintu P, Tatawatorn A, Phiencharoen S, Choketaweesak N, Nathalang O, Attajarusit Y, et al. Allocation criteria to increase chances of kidney transplantation for highly HLA-sensitized patients. *J Hematol Transfus Med.* 2014;24:103-9.
2. O-Charoen R, Kupatawintu P, Sinsiri S, Salee S, Tatawatorn A, Nathalang O, et al. Preliminary results of selection criteria for cadaveric kidney transplantation by Thai Red Cross. *Transplant Proc.* 2000;32:1574-5.
3. 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.
4. Kupatawintu P, Phiencharoen S, Srisuddee A, Tanaka H, Tado-koro K, Nathalang O. HLA-A, -B, -DR haplotype frequencies in the Thai Stem Cell Donor Registry. *Tissue Antigens.* 2010;75:730-6.
5. Smith SM, Laurie AD, Potter HC, McGettigan BD. HLA-B27 real-time PCR using TaqMan-MGB sequence specific probes. *NZ J Med Lab Sci.* 2014;68:4-8.
6. Russo CD, Lisi L, Fabbiani M, Gagliardi D, Fanti I, DiGiambenedetto S, et al. Detection of HLA-B*57:01 by real-time PCR: implementation into routine clinical practice and additional validation data. *Pharmacogenomics.* 2014;15:319-27.
7. Kang X, Chen R, Han M, Liu Z, Liu J, Dai P, et al. Rapid and reliable genotyping of HLA-B*58:01 in four Chinese populations using a single-tube duplex real-time PCR assay. *Pharmacogenomics.* 2016;17:47-57.
8. Nguyen DV, Vidal C, Chu HC, Do NT, Tran TT, Le HT, et al. Validation of a novel real-time PCR assay for detection of HLA-B*15:02 allele for prevention of carbamazepine - induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in individuals of Asian ancestry. *Hum Immunol.* 2016;77:1140-6.
9. Imperiali C, Alía-Ramos P, Padró-Miquel A. Rapid detection of HLA-B*51 by real-time polymerase chain reaction and high-resolution melting analysis. *Tissue Antigens.* 2015;86:139-42.
10. Kuchipudi P, Gault L, Levis D, Rosenberg JC, Ho S. The OPO experience with (almost) real time HLA typing by real-time PCR. *Human Immunol.* 2013;74(Suppl):147.
11. Frohn C, Fricke L, Puchta JC, Kirchner H. The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. *Nephro Dial Transplant.* 2001;16:355-60.
12. Jolly EC, Key T, Rasheed H, Morgan H, Butler A, Pritchard N, et al. Preformed donor HLA-DP-specific antibodies mediate acute and chronic antibody-mediated rejection following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12:2845-8.
13. Chandanayingyong D. The HLA-B15. *J Hematol Transfus Med.* 2014;24:157-62.
14. O-Charoen R, Kupatawintu P. Selection criteria for transplantation. In: Jirasiridham S ed. *Textbook of kidney donation for transplantation.* Bangkok : Krungtepejchasarn Publishing, 2001:14-21.