

การตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ที่รักษาด้วยยาต้านไวรัส สูตรพื้นฐานโดยวิธี Real time PCR

Screening of HLA-B*5701 in HIV infected/AIDS patients receiving
first line antiretroviral therapy using developed real time PCR

■ พูนทรัพย์ ผลาจรศักดิ์^{1*} ศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์¹ ทศนีย์ ศรีวิชัย¹
Poonsub Palacajornsuk^{1*} Sakchai Dettrairat¹ Tassanee Srivichai¹
นิภาพรณ ลีตระกูล² วารุณี คุณาชีวะ¹
Nipapan Leetrakool² Warunee Kunachiwa¹

¹ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ห้องปฏิบัติการ HLA งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Abstract

There are some recent reports that the screening of HLA-B*5701 has helped predicting the occurrence of hypersensitivity to abacavir in HIV infected/AIDS patients. The researcher, therefore, developed Real time PCR method for screening of HLA-B*5701 in the HIV infected/AIDS patients to prevent hypersensitivity to abacavir by collecting the blood samples collected from 147 HIV infected/AIDS patients and first screened for HLA-B17 (HLA-B57 and HLA-B58) by flow cytometry. The results revealed that 22 samples were positive (15%) and 125 samples were negative (85%) for HLA-B17. Then, all of the positive samples were subjected to screening of HLA-B*5701 by the developed Real time PCR. The results revealed that 2 samples were HLA-B*5701 (1.4%). In addition, 88 blood samples of HIV infected/AIDS patients were collected and subjected to screening of HLA-B*5701 by the developed Real time PCR. The results revealed that all of the samples were negative. From this study, 2 samples out of the collected 235 blood samples were HLA-B*5701 positive (0.85%). It can be concluded that the developed Real time PCR can be used for screening HLA-B*5701 which will be useful for planning to prevent the occurrence of hypersensitivity to abacavir before treatment HIV infected/AIDS patients with abacavir.

Keywords: HLA-B*5701, HIV infected patients, AIDS patients, Antiretrovirus, Real time PCR

บทคัดย่อ

มีรายงานว่า การตรวจกรอง HLA-B*5701 สามารถช่วยทำนายการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินต่อยา abacavir ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ได้ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดพัฒนาวิธี Real time PCR เพื่อใช้ในการตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ 147 ราย ตรวจกรอง HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) ด้วยวิธีโพลีโตเมทรี พบผลบวก 22 ราย (15%) และผลลบ 125 ราย (85%) จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกทุกรายด้วยวิธีโพลีโตเมทรีมาตรวจกรอง HLA-B*5701 ด้วยวิธี Real time PCR ที่พัฒนาขึ้น พบผลบวก 2 ราย (1.4%) นอกจากนี้ได้เก็บ ตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ มาตรวจกรอง HLA-B*5701 ด้วยวิธี Real time PCR เพิ่มอีก 88 ราย พบว่าให้ผลลบทุกราย จากงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างเลือดทั้งหมด 235 ราย พบ HLA-B*5701 จำนวน 2 ราย (0.85%) สรุปได้ว่าวิธี Real time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจกรอง HLA-B*5701 ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการ รักษาด้วยยาต้านไวรัส abacavir เพื่อป้องกันการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินต่อยา abacavir ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์

คำรหัส: HLA-B*5701 ผู้ติดเชื้อ HIV ผู้ป่วยเอดส์ ยาต้านไวรัส Real time PCR

บทนำ

แม้ว่ายาต้านไวรัส HIV สามารถชะลอการดำเนินโรคและลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ได้ โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวน ลดปริมาณเชื้อไวรัส HIV ในกระแสเลือด จนตรวจวัดไม่ได้ (viral load < 50 copies/mL) ช่วยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T lymphocytes ป้องกันหรือลดอัตราการเกิดเชื้อฉวยโอกาส ลดอัตราหรือระยะเวลาการเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาล ทำให้ผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์มีชีวิตที่ยืนยาว และมีคุณภาพชีวิตดีขึ้น¹⁻⁴ แต่ยังพบปัญหาในการรักษา คือ มีการกลายพันธุ์ของเชื้อ HIV เป็นผลให้เกิดการดื้อต่อยาต้านไวรัสได้ ทำให้เกิดความล้มเหลวในการรักษา^{5,6} ผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ส่วนหนึ่งจะต้องหยุดยาหรือจำเป็นต้องได้รับการปรับเปลี่ยนสูตรยาต้านไวรัส HIV เป็นสูตรทางเลือกที่เหมาะสมต่อไป

ถึงแม้ว่ายา abacavir ไม่ได้เป็นยาต้านไวรัส HIV สูตรพื้นฐานในการรักษาผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ แต่ถ้าผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ดื้อยาสูตรพื้นฐาน แพทย์จะมีการปรับการใช้ยาจากสูตรพื้นฐานไปเป็นยาสูตรทางเลือก ยา abacavir เป็นทางเลือกหนึ่งที่แพทย์นำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับการรักษาด้วยยา abacavir มีรายงานพบภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน (hypersensitivity) ต่อยา 2-3% และมักเกิดอาการใน 6 สัปดาห์แรกหลังจากรับประทานยานี้ โดยมีอาการไข้สูง มีผื่นขึ้นกระจายทั่วตัว ลักษณะเป็นปื้นแดงร่วมกับตุ่มแดงเม็ดเล็กๆ คล้ายผด อาจคันหรือไม่ก็ได้ อ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง ปวดข้อเจ็บคอ ไอ หายใจหอบเหนื่อย ระดับเอนไซม์ transaminase สูงขึ้น ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์บางรายถึงแก่ชีวิตได้ เมื่อผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์รายใดเกิดภาวะภูมิคุ้มกัน

ไวเกินต่อยา abacavir แพทย์จะต้องหยุดการใช้ยานี้ ตลอดไป ถึงแม้ว่าอาการแพ้ยาดีขึ้นแล้วก็ตาม ปัจจุบันมีรายงาน พบว่าภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินจากการได้รับยาต้านไวรัส abacavir มีความสัมพันธ์กับ HLA-B*5701 ด้วย odd ratio 117 เท่าเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับไวเกินต่อยา [(95% confidence interval, 29-481); corrected P value < 0.0001]⁷ โดยพบว่า มีค่าพยากรณ์ลบสูงกว่า 90% หมายความว่าผู้ที่มีผลการตรวจ DNA ให้ผลเป็นลบ ซึ่งเป็น HLA allele อื่นที่ไม่ใช่ HLA-B*5701 จะไม่เกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินเนื่องจากใช้ยา abacavir คิดเป็น 90% ในทุกเชื้อชาติ ส่วนค่าพยากรณ์บวก หมายถึงผู้ที่มีผลการตรวจเป็นบวก ซึ่งเป็น HLA-B*5701 allele พบว่ามีความหลากหลายในชนชาติต่างๆ นอกจากนี้มีรายงานว่าในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ชาวผิวขาวมีอุบัติการณ์เกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินต่อยา abacavir สูงประมาณ 4-8%⁹⁻¹² และมีรายงานว่าผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ในประเทศออสเตรเลียและประเทศอังกฤษมีการตรวจกรอง HLA-B*5701 ก่อนได้รับการรักษาด้วยยา abacavir ทำให้ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินจากการได้รับยานี้^{13, 14}

ดังนั้นการตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ จึงมีความสำคัญสำหรับแพทย์ในการพิจารณาก่อนที่จะเริ่มรักษาด้วยยา abacavir หรือยาที่มี abacavir เป็นส่วนประกอบ เป็นการช่วยในการแยกผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินต่อยา abacavir ออกจากผู้ที่สามารถให้ยาต้านไวรัสชนิดนี้ได้โดยไม่เสี่ยงต่อการเกิดภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินต่อยา ไม่เกิดอาการแพ้หรือมีผลข้างเคียงใดๆ ทำให้สามารถให้ยาต้านไวรัสชนิดนี้ได้อย่างต่อเนื่องครบถ้วน

ตามเวลาที่ต้องการ มีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ดีขึ้น ไม่เกิดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อฉวยโอกาส ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์มีคุณภาพชีวิตที่ดี สามารถดูแลตนเอง ทำงานได้ และทำให้สามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV ได้อย่างได้ผลโดยไม่ต้องเปลี่ยนยาในการรักษา¹⁵

ปัจจุบันวิธีมาตรฐานในการตรวจ HLA typing คือวิธี Polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) โดยการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วย allele specific primers ที่จำเพาะกับ HLA allele แต่ละชนิด วิเคราะห์หาชนิดของ HLA ด้วย gel electrophoresis หรือวิธี Polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) probes reverse line blot hybridization เป็นการเพิ่ม ปริมาณ DNA โดยใช้ locus specific primers และวิเคราะห์ ชนิดของ HLA จากผลการทำ hybridization กับ HLA probe ชนิดต่างๆ ที่ตรึงอยู่บน nylon membrane โดยทั่วไปการตรวจทั้งสองวิธีนี้ เป็นการตรวจขั้นต้น เพื่อให้ทราบว่า มี HLA-B*57 ในตัวอย่าง DNA ของบุคคลนั้นๆ หรือไม่ เป็นการตรวจที่มีความละเอียดระดับต่ำถึงปานกลาง หากพบว่าบุคคลใดมี HLA-B*57 จะต้องตรวจด้วยวิธีที่มีความละเอียดระดับสูง (high resolution) เพื่อศึกษาว่าเป็น HLA-B*5701 หรือไม่ โดยเพิ่มการตรวจที่จำเพาะต่อกลุ่มของ HLA-B*57 วิธี PCR-SSP และ PCR-SSO ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 4-8 ชั่วโมง และชุดตรวจแต่ละชนิดมีราคาค่อนข้างสูง ปัจจุบันวิธี Real time PCR ที่มีการเพิ่มแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR product สามารถตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้น เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ไม่ยุ่งยากในการทำและการตรวจวิเคราะห์ผล

ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดพัฒนาวิธีการตรวจกรอง HLA-B* 5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์โดยวิธี Real time PCR เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในประชากรไทยสำหรับแพทย์ในการพิจารณา ก่อนเริ่มรักษาด้วยยา abacavir หรือยาที่มี abacavir เป็นส่วนประกอบ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดที่ศึกษาเป็นเลือดจากกลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสสูตรพื้นฐานที่เหลือจากการส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการ HIV ของแขนงภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 147 ราย นำมาตรวจกรอง HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) โดยวิธีโพลีโตเมทรี จากนั้นนำตัว

อย่างเลือดที่ให้ผลบวกมาสกัด DNA และตรวจกรอง HLA-B* 5701 โดยวิธี Real time PCR ที่พัฒนาขึ้น นอกจากนี้ ได้เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์เพิ่มเติมอีกจำนวน 88 ราย ทำการตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR โดยตรง

2. การตรวจกรอง HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) โดยวิธีโพลีโตเมทรี (whole blood staining method)

เติม whole blood ปริมาตร 100 μ L ลงในหลอดควบคุม และหลอดทดสอบแล้วเติม PBS+1%BSA+0.02%NaN₃ ปริมาตร 5 μ L ในหลอดควบคุมและเติม Biotinylated monoclonal antibody-HLA-B17 (OneLamda Inc., USA) เจือจาง 1:10 ปริมาตร 5 μ L ในหลอดทดสอบแล้ว incubate ที่ 4°C นาน 30 นาที ในที่มืด เติม Optilys C lysing solution (Immunotech, France) ปริมาตร 500 μ L แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ เติม Streptavidin conjugated with PE (BioLegend, USA) เจือจาง 1:20 ปริมาตร 20 μ L แล้ว incubate ที่ 4°C นาน 30 นาที ในที่มืด ล้างด้วย PBS, pH 7.2 จำนวน 3 รอบ สูดท้ายเติม 0.5% paraformaldehyde ปริมาตร 500 μ L ผสมให้เข้ากันและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลีโตเมทรี รุ่น CYTOMICS[®] FC 500 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA)

3. การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกด้วยวิธีโพลีโตเมทรี จำนวน 22 ราย และตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ มาสกัด DNA เพิ่มอีกจำนวน 88 รายโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Germany)

4. การตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR

ส่วนประกอบของ PCR reaction ใช้น้ำยาสำเร็จรูป Light Cycler[®] TaqMan[®] Master (Roche Applied Science, Germany) ลำดับเบสของ primers และ probe ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในงานวิจัย (ตารางที่ 1) ทำ Real time PCR (ตารางที่ 2) ควบ คู่กับ positive control (HLA-B*5701) และ negative control (HLA-B58) จากนั้นวิเคราะห์ PCR product ด้วย LightCycler[®] Software 4.1

Table 1. Primers and probe developed for this study

Primer/Probe name	Sequence 5' → 3'
B5701SI primer	TCT CAC ATC ATC CAG ITG A
B5701B primer	CCA CTT GCG CTG GGT
B5701P probe	6FAM-TAT GGC TGC GAC GTG GGG C-BBQ

Table 1. Primers and probe developed for this study

Parameter	Program				
	Pre-incubation	Amplification			Cooling
Analysis mode	None	Quantification			None
Cycles segment	1	45			1
Segment	1	1	2	3	1
Target temperature (°C)	95	95	69	72	40
Hold time [min:sec]	10:00	00:5	00:25	00:01	00:30
Slope [°C/s]	20	20	20	20	20
Sec target (°C)	0	0	59	0	0
Step size (°C)	0	0	0.5	0	0
Step delay (cycles)	0	0	1	0	0
Acquisition mode	None	None	Single	None	None

ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจกรอง HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) โดยวิธีโพลีโตเมรี

จากตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ จำนวน 147 ราย พบผลบวก 22 ราย (15%) มีค่า mean fluorescence intensity อยู่ในช่วง 8.460-32.200 และผลลบ 125 ราย (85%) มีค่า mean fluorescence intensity อยู่ในช่วง 0.455 - 4.650 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากเครื่องโพลีโตมิเตอร์ ดังรูปที่ 1.

2. ผลการตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR

DNA ของผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ที่ให้ผลบวก HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) ด้วยวิธีโพลีโตเมรีจำนวน 22 ราย นำมาตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR พบผลบวก จำนวน 2 ราย คิดเป็น 1.4% ของตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์จำนวน 147 ราย และตรวจสอบเพื่อยืนยันผลของ HLA-B*5701 โดยวิธี PCR-Sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO) reverse line blot hybridization (INNO-LiPA HLA-B Update plus, INNOGENETIC, Belgium)

พบว่าให้ผลตรงกัน สำหรับผลการตรวจกรอง HLA-B*5701 จาก DNA ของผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ จำนวน 88 ราย โดยวิธี Real time PCR โดยตรง พบว่าให้ผลลบทุกราย ตัวอย่าง amplification curves ของการตรวจกรอง HLA-B*5701 ที่ให้ผลลบและผลบวก เปรียบเทียบกับ negative control แสดงดังรูปที่ 2 A และ B ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ศึกษา HLA-B17 (HLA-B57 และ HLA-B58) โดยใช้วิธีโพลีโตเมรีในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์จำนวน 147 ราย พบ HLA-B17 จำนวน 22 ราย (15%) และตรวจกรอง HLA-B*5701 ด้วยวิธี Real time PCR พบ 2 ราย นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ มาสกัด DNA และทำการตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเพิ่มเติมอีกจำนวน 88 ราย พบว่า ให้ผลลบทุกรายในการพิจารณาหรือตัดสินใจเลือกวิธีการตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ผู้ป่วยเอดส์ก่อนได้รับยา abacavir ขึ้นอยู่กับว่าในประชากรนั้นๆ มีอุบัติการณ์ในการตรวจพบ HLA-B*5701

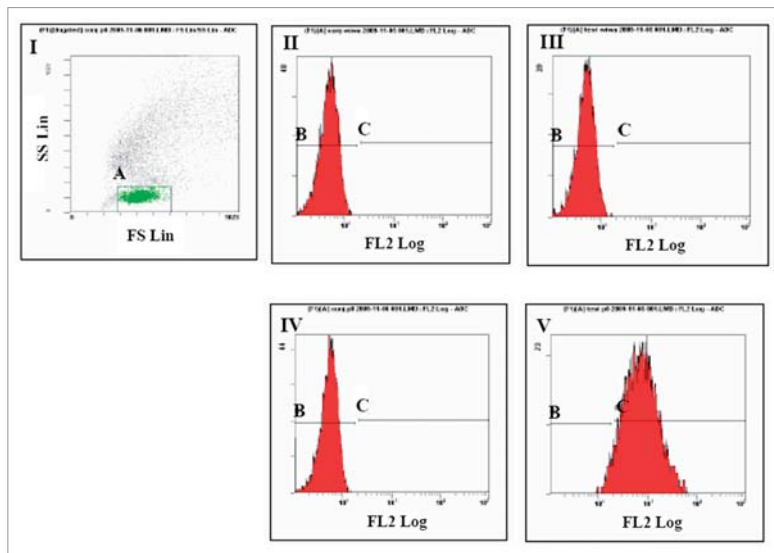


Figure 1. Example of FACS profile of HLA-B17 screening using flow cytometry
 I = dot plot แสดงเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ (A = ประชากรของ lymphocyte ที่ต้องการศึกษา)
 II, III = histogram แสดง fluorescence intensity ของตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบของหลอดควบคุม และหลอดทดสอบ ตามลำดับ
 IV, V = histogram แสดง fluorescence intensity ของตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกของหลอดควบคุม และหลอดทดสอบ ตามลำดับ
 (B = เซลล์ lymphocyte ที่ไม่มีแอนติเจน HLA-B17 ซึ่งไม่สามารถวัด fluorescence intensity ได้;
 C = เซลล์ lymphocyte ที่มีแอนติเจน HLA-B17 สามารถวัด fluorescence intensity ได้)

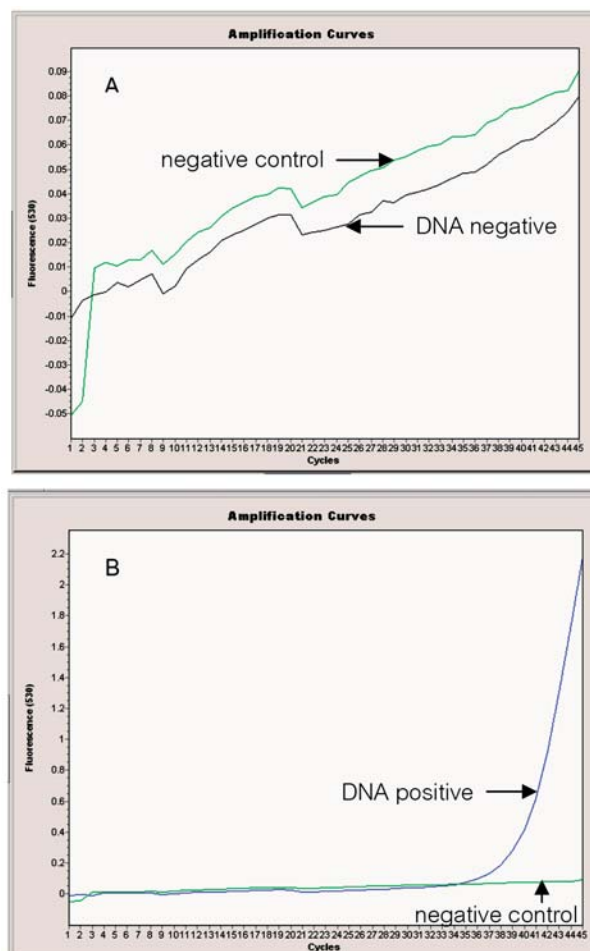


Figure 2. Example of amplification curves of HLA-B*5701 screening using Real time PCR from sample of DNA negative (A) and positive (B) results

ได้มากหรือน้อย หากมีอุปสรรคในการตรวจพบ HLA-B*5701 มาก สามารถเลือกใช้วิธี Real time PCR ในการตรวจกรองโดยไม่ต้องตรวจ HLA-B17 ก่อน แต่หากมีอุปสรรคในการตรวจพบ HLA-B*5701 น้อย เช่น จากงานวิจัยนี้ได้ศึกษาใน ผู้ติดเชื้อ HIV/ ผู้ป่วยเอดส์ จำนวน 235 ราย พบ HLA-B*5701 จำนวน 2 ราย คิดเป็น 0.85% และนำ DNA ไปตรวจสอบยืนยัน ผลของ HLA-B*5701 โดยวิธี PCR-SSO reverse line blot hybridization พบว่าให้ผลตรงกัน ดังนั้นก่อนที่ผู้ติดเชื้อ HIV/ ผู้ป่วยเอดส์ จะได้รับยา abacavir ควรตรวจกรองด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรีก่อนวิธี Real time PCR เนื่องจากปัจจุบันห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลต่างๆ มีเครื่องโพลีไซโตเมทรีใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับตรวจหาระดับเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T lymphocytes เพื่อประเมินผลการรักษา ผู้ติดเชื้อ HIV ด้วยยาต้านไวรัส นอกจากนี้วิธีโพลีไซโตเมทรี ยังสามารถลดจำนวนตัวอย่างและค่าใช้จ่ายในการตรวจกรองได้ ซึ่งค่าใช้จ่ายในการตรวจกรอง HLA-B17 ด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรี ราคาต้นทุนประมาณ 250 บาท ต่อสิ่งส่งตรวจ 1 ราย ส่วนค่าใช้จ่ายในการสกัด DNA และตรวจกรอง HLA-B*5701 โดยวิธี Real time PCR ที่พัฒนาขึ้น ราคาต้นทุนประมาณ 450 บาท ต่อสิ่งส่งตรวจ 1 ราย สำหรับการตรวจเพื่อยืนยัน HLA-B*5701 โดยวิธี PCR-SSO reverse line blot hybridization ราคาประมาณ 3,000 บาทขึ้นไป ขึ้นอยู่กับระดับของความละเอียด ที่เลือกใช้ (ระดับต่ำ ระดับปานกลาง หรือระดับสูง) ในงานวิจัยนี้ การตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ ผู้ป่วยเอดส์ ด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรี ก่อนการตรวจกรองวิธี Real time PCR และตรวจยืนยันผลด้วยวิธี PCR-SSO reverse line blot hybridization สามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจได้

36.27% ในปี 2009, Airo P และคณะ¹⁶ ได้รายงานว่าการตรวจกรอง HLA-B*5701 ในผู้ติดเชื้อ HIV/ ผู้ป่วยเอดส์ด้วยวิธีโพลีไซโตเมทรีก่อนการตรวจกรองด้วยวิธี PCR-SSP และตรวจยืนยันผลด้วยวิธี Sequence-based typing สามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจได้ 72.2%

นอกจากนี้ การตรวจกรอง HLA-B*5701 สามารถทำได้โดยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น วิธี Sequence-specific oligonucleotide (SSO) probe วิธี PCR-Sequence specific primers (SSP) วิธี Real time PCR¹⁷⁻²² และวิธีโพลีไซโตเมทรี^{16,23} ส่วนการตรวจยืนยัน HLA-B*5701 นิยมทำโดยวิธี PCR-Sequence specific oligonucleotide (SSO) reverse line blot hybridization หรือวิธี Sequence-based typing^{12, 16}

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้มอบทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2551 เพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ รศ. ดร. พญ. ญัฐธิดา หิรัญกาญจน์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ DNA control HLA-B*5701

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. เพ็ญภา คลังสินศิริกุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำปรึกษาเรื่องโพลีไซโตเมทรีและขอขอบคุณ คุณจันทร์แรม พรหมจิมและคุณหทัยกาญจน์ ศิวาโมกข์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อ HIV/ ผู้ป่วยเอดส์ ที่ส่งตรวจที่แขนงภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

1. Marshner IC, Collier AC, Coombs RW, Daquilar RT, GeGruttola V, Fisch MA, et al. Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to assess the clinical benefit of antiretroviral therapy. J Infect Dis 1998; 177: 40-7.
2. Sterne JA, Hernam MA, Ledergerber B, Tilling K, Weber R, Sendi P, et al. Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. Lancet 2005; 366: 378-84.
3. Kitahata MM, Van Rompaey Se, Shields AW. Physician experience in the care of HIV-infected persons is associated with earlier adoption of new antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 24: 106-14.
4. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 247-77.
5. Gallant JE. Antiretroviral drug resistance and resistance testing. Top HIV Med 2006; 13: 138-42.
6. Baxter JD, Mayer DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winter MA, et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. AIDS 2000; 14: F83-93.

7. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ4 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002; 359: 727-32.
8. The XVI International AIDS Conference. 2006. Abacavir hypersensitivity becoming easier to predict using pharmacogenetic markers. (online). 16 August. Available <http://www.thebody.com/content/art16156.html> (1 January 2011).
9. Hetherington S, McGuirk S, Powell G, Cutrell A, Naderer O, Spreen B, et al. Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin Ther* 2001; 23: 1603-14.
10. Cutrell AG, Hernandez JE, Fleming JW, Edwards MT, Moore MA, Brothers CH, et al. Updated Clinical risk factor analysis of suspected hypersensitivity reactions to abacavir. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 2171-2.
11. Rauch A, Nolan D, Martin A, McKinnon E, Almeida CA, Mallal S. Prospective genetic screening decreases the incidence of abacavir hypersensitivity reactions in the Western Australian HIV Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 99-102.
12. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Wnuk A, Urbańska A, Fuksińska K, Bander D, et al. Introduction of pharmacogenetic screening for the human leucocyte antigen (HLA) B*5701 variant in Polish HIV-infected patients. *HIV Med* 2010; 11: 345-348.
13. Lucas A, Nolan D, Mallal S. HLA-B*5701 screening for susceptibility to abacavir hypersensitivity. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 591-3.
14. Waters LJ, Mandalia S, Gazzard B, Nelson M. Prospective HLA-B*5701 screening and abacavir hypersensitivity: a single centre experience. *AIDS* 2007; 21: 2533-4.
15. Park WB, Choe PG, Song KH, Lee S, Jang HG, Jeon JH. Should HLA-B*5701 screening be performed in every ethnic group before starting abacavir? *Clin Infect Dis* 2009; 48: 365-7.
16. Airo P, Scarsi M, Malagoli A, Carella G, Izzo I, Carosi G, et al. The convenience of flow cytometry for HLA-B*5701 screening to prevent abacavir hypersensitivity reactions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 51: 361-2.
17. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing 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.
18. Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue antigens* 1995; 45: 81-90.
19. Martin AM, Nolan D, Mallal S. HLA-B*5701 typing by sequence-specific amplification: validation and comparison with sequence-based typing. *Tissue antigens* 2005; 65: 571-4.
20. Saag M, Balu R, Phillips E, Phillips E, Brachman P, Martorell C, et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-B*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1111-8.
21. Mallal S, Phillips EJ, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008; 358: 568-79.
22. Hammond E, Mamotte C, Nolan D, Mallal S. HLA-B*5701 typing: evaluation of an allele-specific polymerase chain reaction melting assay. *Tissue antigens* 2007; 70: 58-61.
23. Martin AM, Kreuger R, Almeida CA, Nolan D, Phillips E, Mallal S. A sensitive and rapid alternative to HLA typing as a genetic screening test for abacavir hypersensitivity syndrome. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 353-7.