

## นิพนธ์ต้นฉบับ

### การพัฒนา in-house real-time polymerase chain reaction

#### สำหรับการตรวจ HLA-B locus

จิราภรณ์ ประเสริฐสังข์ ศศิจิต เวชแพศย์ โกมล หลวงตระกูล และ วิโรจน์ จงกลวัฒนา

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

#### บทคัดย่อ

**บทนำ** Human leukocyte antigen (HLA) มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีหน้าที่นำเสนอเปปไทด์ของแอนติเจนที่แปลกปลอมให้กับ T-cells ยีน HLA มีความหลากหลายในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ HLA-B พบว่ามีความหลากหลายมากที่สุด ปัจจุบันมีการตรวจ HLA เพื่อดูยีนที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการแพ้ยาในโรคบางชนิด และเพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะ วิธี real-time polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่นิยมมากขึ้นนำมาใช้ในการตรวจ HLA-typing เนื่องจากง่ายต่อการใช้งานและใช้เวลาในการตรวจสั้นกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบันคือ PCR-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO), PCR-sequence-specific primer (PCR-SSP) และ real-time PCR **วัตถุประสงค์** เพื่อพัฒนาชุดตรวจ HLA typing (HLA-B locus) โดยใช้ in-house real-time PCR สำหรับการตรวจในงานประจำและลดค่าใช้จ่ายในการซื้อชุดตรวจจากต่างประเทศ **วัสดุและวิธีการ** ตัวอย่างตรวจได้จากผู้บริจาคเกล็ดเลือด ซึ่งทราบผลตรวจ HLA-B แล้ว ที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มาทำการตรวจด้วยวิธี real-time PCR โดยเตรียม in-house primers ในการตรวจ HLA-B locus ทั้งหมด 22 คู่ โดยตรวจจำนวน 45 ตัวอย่าง และ B\*15 ทั้งหมด 5 คู่ โดยตรวจจำนวน 10 ตัวอย่าง **ผลการศึกษา** การตรวจ HLA-B typing และ HLA-B\*15 ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ in-house primers พบว่าให้ผลบวกตรงตามวิธีที่ใช้ตรวจในงานประจำ **สรุป** การทำ in-house real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA B-locus ให้ผลตรวจถูกต้อง รวดเร็ว รวมระยะเวลาในการทำตั้งแต่เตรียมตัวอย่างจนถึงการอ่านผล น้อยกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน รวมถึงต้นทุนต่อการทดสอบเมื่อเทียบกับชุดทดสอบของ real-time PCR จากต่างประเทศพบว่ามีต้นทุนที่ต่ำกว่าสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก

**คำสำคัญ :** ● เอชแอลเอ-บี ● เรียลไทม์ พีซีอาร์

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2564;31:253-9.

ได้รับต้นฉบับ 24 มิถุนายน 2564 แก้ไขบทความ 30 กรกฎาคม 2564 รับลงตีพิมพ์ 23 สิงหาคม 2564

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.พญ. ศศิจิต เวชแพศย์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 2 ถนนพราวณิก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 E-mail: sasijit.vej@mahidol.ac.th

**Original article****Development of in-house real-time polymerase chain reaction for HLA-B locus typing**

Jiraporn Prasertsang, Sasijit Vejbaesya, Komon Luangtrakool and Viroje Chongkolwatana

Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

**Abstract:**

**Introduction:** The human leukocyte antigen (HLA) play an important role in the immune system by presenting peptides of the foreign antigen to the T-cells. HLA genes are diverse in population especially HLA-B which is the most polymorphic. HLA is currently being tested to look for genes that are associated with diseases, drug allergy and for organ transplantation. Currently, real-time polymerase chain reaction (PCR) technique has been more popular in HLA typing due to more convenience and less time consumption than the other techniques. The standard methods currently used are PCR-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO), PCR-sequence-specific primer (PCR-SSP), and real-time PCR. **Objective:** To develop HLA typing (HLA-B locus) assay using in-house real-time PCR for routine testing and reduce the cost of purchasing commercial kits. **Materials and Methods:** Platelet samples from the donors with known HLA-B types at the Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital were typed by the developed in-house real-time PCR. A total of 45 samples were typed by 22 pairs of primers for HLA-B and 10 samples were typed by 5 pairs of primers for HLA-B\*15. **Results:** Similar results were observed when the in-house real-time PCR assay for HLA-B and B\*15 were compared to the routine methods. **Conclusion:** The developed in-house real-time PCR for typing of HLA-B is the useful technique with rapid and accurate results and less cost per test than the commercial real-time PCR kits.

**Keywords :** ● HLA-B ● Real-time PCR

**J Hematol Transfus Med. 2021;31:253-9.**

## บทนำ

Human leukocyte antigen (HLA)<sup>1</sup> เป็นแอนติเจนที่พบบนเม็ดเลือดขาว และเนื้อเยื่ออื่นๆ ของร่างกาย เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกาย โดยโมเลกุลของ HLA ทำหน้าที่จับและนำเสนอเปปไทด์ ของแอนติเจนที่เป็นสิ่งแปลกปลอม ซึ่งผ่านกระบวนการนำเสนอแอนติเจนเข้าสู่เซลล์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์แล้ว หรือนำเสนอเปปไทด์ของตัวเองออกสู่ผิวเซลล์ เพื่อให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน<sup>1-2</sup> สามารถจำแนกสิ่งแปลกปลอมนั้นได้ HLA ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6<sup>3</sup> เป็นที่รู้จักกันว่าเป็นระบบพันธุกรรมที่หลากหลายที่สุดในมนุษย์ ประกอบด้วย HLA class I และ class II<sup>1-2</sup> ซึ่งเป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายอวัยวะ การแพ้ยา และมีความสัมพันธ์ในการเกิดโรคบางชนิดปัจจุบันมีวิธีการตรวจ HLA ที่ใช้ในทางปลูกถ่ายอวัยวะ<sup>4-6</sup> ได้แก่ PCR-sequence specific oligonucleotide (PCR-SSO)<sup>7-8</sup>, PCR-sequence-specific primer (PCR-SSP)<sup>7,9-10</sup> และ real-time PCR<sup>11-13</sup> นอกจากนี้แล้วยังมีการตรวจ HLA เพื่อหาความสัมพันธ์กับการแพ้ยา เช่นการตรวจ HLA-B\*15:02 เพื่อหาการแพ้ Carbamazepine<sup>14-17</sup> real-time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายได้ในทุกรอบของการเพิ่มจำนวน ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมาจากสารเรืองแสงที่ไปจับกับ DNA สายคู่ แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น ปริมาณของแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ โดยทั่วไป DNA ที่เพิ่มจากการทำปฏิกิริยา PCR จะเพิ่มเป็นลักษณะกราฟรูปตัว S (sigmoid หรือ exponential curve) โดยแกน Y แสดงสัญญาณการเรืองแสง และแกน X แสดงจำนวนรอบของการเพิ่มจำนวน การทำ real-time PCR เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำ การตรวจวัดผลผลิต PCR ในเวลาที่เกิดขึ้นจะทำเฉพาะในช่วง exponential phase ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับสัญญาณการเรืองแสงสูงเหนือระดับ threshold ซึ่งแปลว่ามีการจับกันของ DNA สายคู่เพิ่มมากขึ้นและมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (exponential) ดังนั้นรูปแบบการตรวจวัดสำหรับเทคนิค real-time PCR เป็นการตรวจวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง ปัจจุบันนี้ที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลได้ใช้วิธี PCR-SSP เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในงานประจำ ซึ่งข้อจำกัดของวิธีนี้คือใช้เวลาทำค่อนข้างมากและมีราคาค่อนข้างสูง สำหรับงานวิจัยนี้มี

วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจ HLA typing (HLA-B locus) โดยใช้ in-house real-time PCR สำหรับการตรวจในงานประจำ และลดค่าใช้จ่ายในการซื้อชุดตรวจจากต่างประเทศ

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่าง DNA ได้จากผู้บริจาคเกล็ดเลือดที่ทราบผลการตรวจ HLA ในระดับยีน ด้วยวิธี PCR-SSP (Morgan HLA ABDR SSP Typing Kit) จากบริษัท TBG Diagnostics Limited, Taiwan จำนวน 45 ตัวอย่างที่มีผลการตรวจ HLA-B typing ที่พบบ่อยในคนไทย ในระหว่างเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ของภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาลมหาวิทยาลัยมหิดล ตามรหัสโครงการ 3802561/(EC2)

### วิธีดำเนินการ

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจ ได้แก่ ปริมาณและความเข้มข้นของ internal control อุณหภูมิและเวลาในการทำ denature, annealing และ extension ของตัวอย่างรวมทั้งจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นได้ทำการหาค่า T<sub>m</sub> calling ของแต่ละตัว จากตัวอย่างที่ทราบผลแล้ว ทั้งหมดโดยจะทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะใช้ตัวอย่างมาทดสอบจำนวนอย่างน้อย 3 ตัวอย่างต่อ 1 อัลลีล แล้วหาค่าเฉลี่ยจากค่า T<sub>m</sub> ทั้ง 3 ชุดนี้ จะได้ค่า T<sub>m</sub> calling ของ primer แต่ละคู่ ซึ่ง primer ที่ใช้ในการทำ B-locus มีทั้งหมด 22 คู่ ใช้ตรวจ 45 ตัวอย่าง และ B\*15 ทั้งหมด 5 คู่ ใช้ตรวจ 10 ตัวอย่าง เริ่มจากนำ standard DNA จากตัวอย่าง QC ของ Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association-APHIA, Australia ที่ผ่านการ typing ด้วยเทคนิค SBT และตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการทำ typing ด้วยวิธี PCR-SSP แล้วมาตรวจวัดคุณภาพและหาปริมาณของ DNA โดยค่า ratio อยู่ที่ช่วง 1.70-2.00 จากการวัดด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (SHIMADZU UV1800, Japan) ที่ความยาวคลื่น 260-280 nM ปริมาณความเข้มข้นของ DNA เป็น 50 ng/μL การตรวจ HLA-B locus ใช้คู่ของ primer ทั้งหมด 22 คู่<sup>10</sup> ดังแสดงใน Table 1 และ HLA-B\*15 ใช้คู่ของ primer ทั้งหมด 5 คู่<sup>18</sup> แสดงใน Table 2 ในแต่ละเส้นของ primer จะใช้ความเข้มข้นเป็น 20 μM และใช้ internal control (IC) ของยีน DRB1 โดยใช้ความเข้มข้น 5 μM ทั้งเส้น sense primer (5'-3' TGCCAAGTGGAGCACCCAA)

**Table 1** HLA allele specific primers for B-locus

| Mix | No. of sense primers | No. of anti-sense primers | Amplicon size (bp.) | $T_m$ calling (°C) | Specificity of HLA-B*  |
|-----|----------------------|---------------------------|---------------------|--------------------|--|
| 1   | 203                  | 285                       | 405                 | 90.97              | 07   |
| 2   | 242                  | 220                       | 564                 | 93.46              | 07, 08, 41, 42, 55   |
| 3   | 243                  | 215                       | 486                 | 80.31              | 13, 15, 46, 55, 56   |
| 4   | 192                  | 214                       | 421                 | 83.76              | 13, 15, 18, 35, 37, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 50, 52, 53         |
| 5   | 187                  | 214                       | 458                 | 84.91              | 15, 18, 35   |
| 6   | 280                  | 281                       | 149                 | 89.31              | 27, 44   |
| 7   | 193                  | 223                       | 369                 | 82.81              | 07, 13, 15, 18, 35, 42, 51, 53, 53, 56                         |
| 8   | 188                  | 212                       | 606                 | 78.70              | 08, 18, 35, 37, 44, 51, 52, 53                                 |
| 9   | 209                  | 217                       | 612                 | 88.51              | 08, 15, 38, 39   |
| 10  | 1719                 | 237                       | 404                 | 92.18              | 15   |
| 11  | 272                  | 218                       | 627                 | 80.23              | 40, 41, 44, 45, 47, 49, 50                                     |
| 12  | 272                  | 393                       | 480                 | 90.59              | 40, 44, 49   |
| 13  | 240                  | 241                       | 460                 | 83.36              | 35, 46, 56, 67   |
| 14  | 209                  | 229                       | 567                 | 82.31              | 07, 15, 27, 38, 40, 48, 81                                     |
| 15  | 242                  | 215                       | 383                 | 79.99              | 07, 13, 15, 18, 35, 39, 40, 45, 50, 54, 55, 56, 82             |
| 16  | 193                  | 216                       | 451                 | 76.18              | 07, 15, 35, 51, 55, 56, 78                                     |
| 17  | 202                  | 236                       | 487                 | 84.35              | 51, 52, 78   |
| 18  | 395                  | 236                       | 421                 | 83.57              | 54, 55   |
| 19  | 209                  | 236                       | 422                 | 82.79              | 07, 08, 13, 27, 39, 40, 51, 52, 55, 56                         |
| 20  | 203                  | 238                       | 551                 | 82.46              | 07, 15, 54, 56, 82   |
| 21  | 194                  | 224                       | 351                 | 79.23              | 57   |
| 22  | 1719                 | 438                       | 421                 | 92.01              | 08, 13, 15, 27, 37, 38, 40, 44, 47, 49, 51, 52, 53, 57, 58, 59 |

**Table 2** Allele specific primers for B15  $T_m$  calling = 81.04

| Mix | No. of sense primers | No. of anti-sense primers | Amplicon size (bp.) | Specificity of HLA-B*   |
|-----|----------------------|---------------------------|---------------------|---|
| 1   | 1343                 | 528                       | 414                 | 15:02, 15:13, 15:31   |
| 2   | 208                  | 223                       | 319                 | 15:13, 44:06, 51:04, 53:01, 53:02, 58:01  |
| 3   | 243                  | 1296                      | 427                 | 15:01, 15:05, 15:08, 15:11, 15:12, 15:14, 15:15, 15:17, 15:19, 15:24, 15:28, 15:30, 15:31, 15:33, 15:34, 46:01, 44:08 |
| 4   | 1343                 | 515                       | 291                 | 15:31   |
| 5   | 189                  | 223                       | 358                 | 15:21   |

และ anti-sense primer (5'-3' GCATCTTGCTCTGTGCAGA) สำหรับการทำให้ real-time PCR โดยการเตรียม 1x reaction ใน tube 0.5 mL. ใส่ master mix ของ CYBR Green I (Roche, Switzerland) 10  $\mu$ L, น้ำ autoclaved deionized water 2  $\mu$ L, sense primer และ anti-sense primer อย่างละ 0.5  $\mu$ L สำหรับ IC sense primer 1  $\mu$ L และ IC anti-sense primer 1  $\mu$ L ใช้ DNA 5  $\mu$ L ใส่ลงใน LightCycler 480 multi well plate แล้วปิดด้วยแผ่น PCR tray seal นำไปปั่นให้ reaction ตกกลงไปที่ก้นหลอด จากนั้นนำเข้าเครื่อง LightCycler 480 Roche Diagnostics, Switzerland ตั้งโปรแกรมการทำ pre-incubation 1 cycle ที่อุณหภูมิ 95°C 5 นาที amplification

45 cycles โดยใช้อุณหภูมิ 95°C 10 วินาที 60°C 10 วินาที และ 72°C 10 วินาที melting curve 1 cycle ที่อุณหภูมิ 95°C 5 วินาที 65°C 60 วินาที และ 97°C continuous, cooling 1 cycle ที่อุณหภูมิ 40°C 30 วินาที โดยใช้ LightCycler 480 software release 1.5.0 SP4 กำหนดค่า melting temperature ( $T_m$ ) และ melting peak ในการวิเคราะห์

#### วิธีคำนวณค่าทางสถิติ

นำค่า  $T_m$  ที่ได้เปรียบเทียบกับค่าความจำเพาะของแต่ละอัลลีล มาคำนวณหา sensitivity, specificity และ accuracy โดยใช้โปรแกรม MedCalc ([https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php))

### ผลการศึกษา

จากตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาตรวจด้วยวิธี real-time PCR จาก in-house primers ทำการตรวจ HLA-B จำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง โดยใช้ primers 22 คู่ เพื่อตรวจ HLA-B\*07, B\*08, B\*13, B\*15, B\*18, B\*27, B\*35, B\*37, B\*38, B\*39, B\*40, B\*44, B\*46, B\*48, B\*50, B\*51, B\*52, B\*54, B\*55, B\*56, B\*57, B\*58 ซึ่งเป็น homozygous จำนวน 8 คน และ heterozygous จำนวน 37 คน ดังแสดงใน Table 3 และตรวจ HLA-B\*15 จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่า ผลการตรวจตรงกัน มีความสอดคล้องกับวิธีที่ใช้ในงานประจำ (PCR-SSP) ดังแสดงใน Table 4 หลังจากนั้นได้นำตัวอย่างที่เป็น blind DNA มาทดสอบเทียบกับผลที่ได้จากชุดตรวจสำเร็จรูปซึ่งได้ผลที่ตรงกัน สำหรับตัวอย่างการทำ melting curve analysis ของ HLA-B locus และ HLA-B\*15:02 ดังแสดงใน Figure 1 และ 2 ตามลำดับ

ในผลการทดลองครั้งนี้ ไม่พบผลลบปลอม (false negative) แต่มี primer บางคู่ที่ให้ผลบวกแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้แก่ primer mix ที่ 15 และ 19 ทำให้เกิดผลบวกปลอมหรือที่เรียกว่า false positive เกิดขึ้น

### วิจารณ์

ในการศึกษานี้ พบผลบวกปลอมในบาง mix ผู้วิจัยจึงได้ทำซ้ำและหาสาเหตุของการเกิดผลบวกปลอม พบว่าสาเหตุเกิดจากการอ่านผล เนื่องจากผลที่ได้ อาจทำให้เกิดการสับสนระหว่างการอ่านกราฟที่เกิดขึ้นว่าส่วนไหนคือ control และส่วนไหนคือ specific เมื่อเทียบค่า  $T_m$  calling ของ primer specific กับ control ที่ได้ทำการทดสอบหา condition ไว้ตั้งแต่ต้น ทำให้การอ่านผลและแปลผลได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมี HLA-B\*40 ที่ PCR-SSP (Morgan kit) สามารถบอกได้ถึง 4 digit แต่ in-house real-time PCR บอกได้เพียง 2 digit

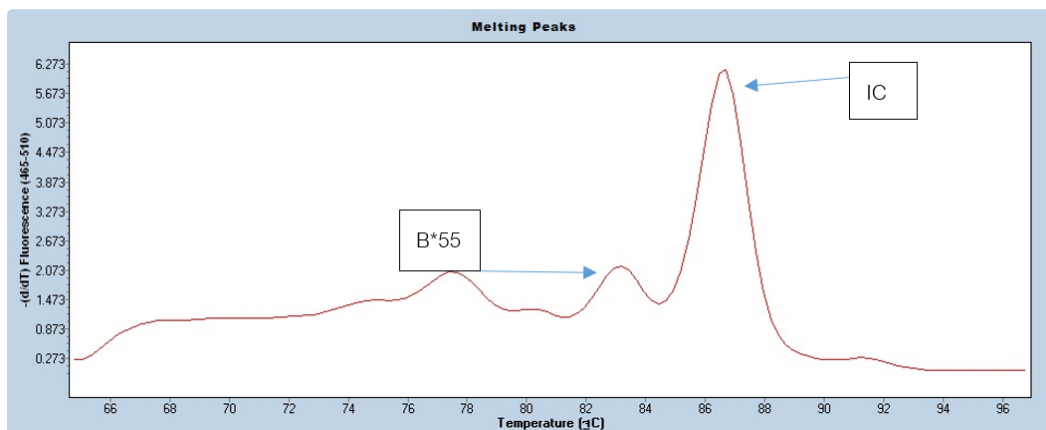
การใช้วิธี real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA เป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะค่อนข้างสูงโดยใช้เวลาในการตรวจสั้นกว่าวิธีอื่นๆ คือใช้เวลา 1.30 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น PCR-SSP ใช้เวลาทำค่อนข้างมากคือ 3 ชั่วโมง และมีหลายขั้นตอน ตั้งแต่ pre-PCR, PCR และ post-PCR รวมถึงขั้นตอนการเตรียมเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยค่าใช้จ่ายต่อการทดสอบสำหรับชุดตรวจ real-time PCR จากต่างประเทศ เมื่อเทียบกันแล้ว ต้นทุนต่อการทดสอบ HLA-B เท่ากับ

**Table 3** HLA-B genotype for Thai samples in the study

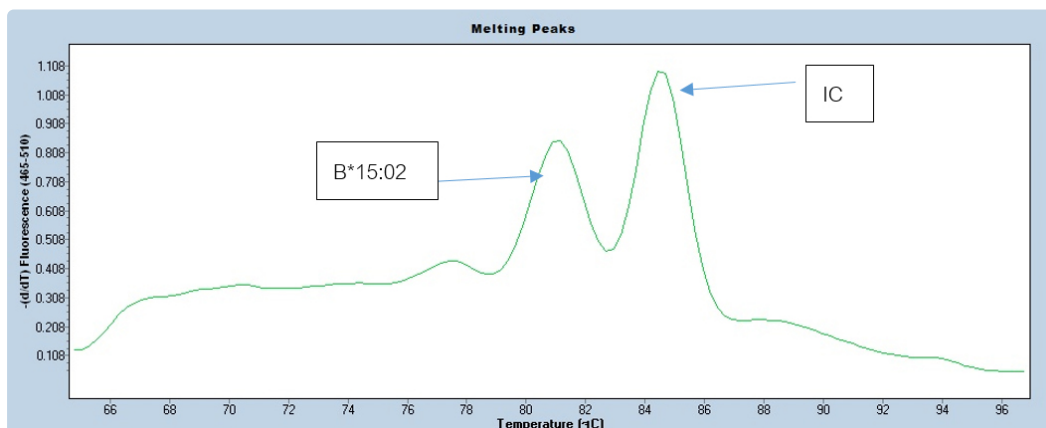
| Sample no. | Routine HLA-B typing<br>(PCR-SSP/SBT) | In-house real-time PCR | Sample no. | Routine HLA-B typing<br>(PCR-SSP/SBT) | In-house real-time PCR |
|------------|---------------------------------------|------------------------|------------|---------------------------------------|------------------------|
| 1.         | B*07,15:02                            | B*07,15:02             | 24.        | B*40,46                               | B*40,46                |
| 2.         | B*07,27                               | B*07,27                | 25.        | B*44,50                               | B*44,50                |
| 3.         | B*07,46                               | B*07,46                | 26.        | B*44,50                               | B*44,50                |
| 4.         | B*08,15:13                            | B*08,15:13             | 27.        | B*46,57                               | B*46,57                |
| 5.         | B*08,27                               | B*08,27                | 28.        | B*48,51                               | B*48,51                |
| 6.         | B*08,40:01                            | B*08,40                | 29.        | B*48,38                               | B*48,38                |
| 7.         | B*13,52                               | B*13,52                | 30.        | B*50,50                               | B*50,50                |
| 8.         | B*13,39                               | B*13,39                | 31.        | B*51,15:02                            | B*51,15:02             |
| 9.         | B*13,46                               | B*13,46                | 32.        | B*51,54                               | B*51,54                |
| 10.        | B*15:02,46                            | B*15:02,46             | 33.        | B*52,15:02                            | B*52,15:02             |
| 11.        | B*15:21,40                            | B*15:21,40             | 34.        | B*52,57                               | B*52,57                |
| 12.        | B*37,37                               | B*37,37                | 35.        | B*54,15:02                            | B*54,15:02             |
| 13.        | B*18,44                               | B*18,44                | 36.        | B*54,55                               | B*54,55                |
| 14.        | B*18,40                               | B*18,40                | 37.        | B*55,15:02                            | B*55,15:02             |
| 15.        | B*27,38                               | B*27,38                | 38.        | B*55,55                               | B*55,55                |
| 16.        | B*27,35                               | B*27,35                | 39.        | B*56,27                               | B*56,27                |
| 17.        | B*35,48                               | B*35,48                | 40.        | B*56,56                               | B*56,56                |
| 18.        | B*35,46                               | B*35,46                | 41.        | B*56,56                               | B*56,56                |
| 19.        | B*37,37                               | B*37,37                | 42.        | B*57,58                               | B*57,58                |
| 20.        | B*37,37                               | B*37,37                | 43.        | B*57,40:01                            | B*57,40                |
| 21.        | B*38,15:02                            | B*38,15:02             | 44.        | B*58,15:21                            | B*58,15:21             |
| 22.        | B*38,39                               | B*38,39                | 45.        | B*58,38                               | B*58,38                |
| 23.        | B*39,39                               | B*39,39                |            |                                       |                        |

**Table 4** Sensitivity, specificity, accuracy for HLA-B locus and HLA- B\*15

| HLA allele | N  | Sensitivity %  | Specificity %  | Accuracy %     |
|------------|----|----------------|----------------|----------------|
| B*07       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*08       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*13       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*15       | 10 | 100(69.15-100) | 100(95.49-100) | 100(95.98-100) |
| B*18       | 2  | 100(15.81-100) | 100(95.8-100)  | 100(95.98-100) |
| B*27       | 5  | 100(47.82-100) | 100(95.98-100) | 100(95.98-100) |
| B*35       | 6  | 100(54.07-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*37       | 6  | 100(54.07-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*38       | 5  | 100(47.82-100) | 100(95.75-100) | 100(95.98-100) |
| B*39       | 4  | 100(39.76-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*40       | 5  | 100(47.82-100) | 100(95.75-100) | 100(95.98-100) |
| B*44       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*46       | 6  | 100(54.07-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*48       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*50       | 4  | 100(39.76-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*51       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*52       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*54       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |
| B*55       | 4  | 100(39.76-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*56       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.98-100) | 100(95.98-100) |
| B*57       | 4  | 100(39.76-100) | 100(95.70-100) | 100(95.98-100) |
| B*58       | 3  | 100(29.24-100) | 100(95.85-100) | 100(95.98-100) |



**Figure 1** Melting peak of HLA-B\*55  $T_m$  calling = 83.22, IC = 86.63



**Figure 2** Melting peak of HLA-B\*15:02  $T_m$  calling = 81.04, IC = 84.61

2,728 บาท เมื่อเทียบกับวิธี in-house real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองเพื่อตรวจเฉพาะ HLA-B locus มีราคาต่อการทดสอบ 901 บาท ซึ่งเป็นमतทดสอบแบบ low resolution เช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตาม การทำ in-house real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA เพื่อการใช้งานประจำ ยังต้องมีปรับความเข้มข้นของ primers แต่ละตัวให้สามารถแปลผลออกมาได้ง่ายและชัดเจนขึ้นกว่านี้ โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของ primers แต่ละคู่เท่ากันหมด ซึ่งทำให้ความสูงของกราฟไม่เท่ากันในแต่ละคู่ของ primers ทำให้ยากต่อการแปลผล

การพัฒนาชุดตรวจ in-house real-time PCR ในครั้งนี้เป็นการทดสอบเพื่อหา conditions ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ primer แต่ละคู่ ซึ่งชุดตรวจนี้ยังไม่ได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างที่เป็น blind DNA อีกทั้ง ข้อจำกัดของชุดตรวจชุดนี้ไม่สามารถแยก HLA-B\*35, 35 ออกจาก HLA-B\*35, 18 และไม่ครอบคลุม B\*15:25 กับ B\*15:32 ที่พบได้ในคนไทย ซึ่งยังต้องมีการพัฒนาในการจัดหา primer เพื่อทำการทดสอบ เพื่อให้สามารถพัฒนาในการนำไปใช้สำหรับงานประจำในอนาคตต่อไป

### สรุป

จากการพัฒนา in-house real-time PCR สำหรับการตรวจ HLA-typing พบว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สามารถใช้เป็นการยืนยันผลตรวจวิเคราะห์ในรายที่ผลตรวจจากวิธีอื่นที่ไม่ชัดเจน เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อน้ำยาจากต่างประเทศ รวมทั้งสามารถเตรียม in-house primers เพื่อใช้ในงานประจำของการตรวจ HLA-typing ได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากทุนพระราชทานพัฒนาศิริราช และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ DNA Laboratory ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง DNA สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

1. Wang M, Claesson MH. Classification of human leukocyte antigen (HLA) supertypes. *Methods Mol Biol.* 2014;1184:309-17.
2. Bodis G, Toth V, Schwarting A. Role of human leukocyte antigens (HLA) in autoimmune diseases. *Methods Mol Biol.* 2018;1802:11-29.
3. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature.* 2003;425:805-11.

4. Leen G, Stein JE, Robinson J, Maldonado Torres H, Marsh SGE. The HLA diversity of the Anthony Nolan register. *HLA.* 2021;97:15-29.
5. Guillaume N. Improved flow cytometry crossmatching in kidney transplantation. *HLA.* 2018;92:375-83.
6. 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 Transfus Med.* 2017;27:217-24.
7. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol.* 2012;882:9-25.
8. Cao K, Chopek M, Fernández-Viña MA. High and intermediate resolution DNA typing systems for class I HLA-A, B, C genes by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Rev Immunogenet.* 1999;1:177-208.
9. Rahal M, Kervaire B, Villard J, Tiercy JM. DNA typing by microbead arrays and PCR-SSP: apparent false-negative or -positive hybridization or amplification signals disclose new HLA-B and -DRB1 alleles. *Tissue Antigens.* 2008;71:238-41.
10. Welsh K, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet.* 1999;1:157-76.
11. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015;439:231-50.
12. Cho EH, Lee SG, Seok JH, Park BY, Lee EH. Evaluation of two commercial HLA-B27 real-time PCR kits. *Korean J Lab Med.* 2009;29:589-93.
13. 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.
14. Jaruthamsophon K, Sriro T, Sukasem C, Limprasert P. Comparison of a new in-house and three published HLA-B\*15:02 screening methods for prevention of carbamazepine-induced severe drug reactions. *PLoS One.* 2016;11:e0155907. doi:10.1371/journal.pone.0155907.
15. Chen P, Lin JJ, Lu CS, Ong CT, Hsieh PF, Yang CC, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B\*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med.* 2011;364:1126-33.
16. Gierbolini J, Giarratano M, Benbadis SR. Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17:885-8.
17. Liu Y, Yu Y, Nie X, Zhao L, Wang X. Association between HLA-B\*15:02 and oxcarbazepine-induced cutaneous adverse reaction: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2018;19:547-52.
18. Barnardo MC, Welsh KI, Vilches C, Maitland K, Bunce M. Allele-specific HLA-B\*15 typing by PCR-SSP and its application to four distinct ethnic populations. *Tissue Antigens.* 1998;51:293-300.

