นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์ผลการตรวจชนิดเอชแอลเอ โดยวิธี Next-Generation Sequencing จากข้อมูลของการทดสอบความชำนาญที่โรงพยาบาลศิริราช

โกมล หลวงตระกูล ดวงพร ศรีนาค รุ่งโรจน์ ทองประดิษฐ์ ศศิจิต เวชแพศย์ และ ปาริชาติ เพิ่มพิกุล
ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ความเป็นมา *วิธีการตรวจหาแอนติเจนเม็ดเลือดขาว human leukocyte antigens (HLA) มีวิวัฒนาการ ตั้งแต่การตรวจโดยใช้วิธีทางซีโรโลยีและปัจจุบันใช้วิธีดีเอ็นเอในการตรวจ อย่างไรก็ตามการตรวจ HLA ยังมีข้อจำกัดในการแยกอัลลีลในระดับความละเอียดสูง จากความก้าวหน้าล่าสุดได้มีการนำเทคโนโลยีของ next-generation sequencing (NGS) มาใช้ในการตรวจหาลำดับเบสเพื่อใช้ในการตรวจหา HLA alleles ที่มีความละเอียดมากขึ้น* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อประเมินผลการตรวจโดยใช้ เทคโนโลยีของ NGS (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA) ซึ่งใช้ระบบของ GS Junior system โดยเปรียบเทียบผลการตรวจกับข้อมูลการตรวจ HLA จากการทดสอบความชำนาญ* ***วัสดุและวิธีการ*** *ใช้ตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบความชำนาญซึ่งทราบผลการตรวจ HLA alleles ด้วยวิธี sequence-based typing (SBT) และ/หรือวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง GS Junior Sequencer (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA) และใช้โปรแกรม Conexio Genomics ASSIGN ATF 454 HLA genotyping ในการวิเคราะห์ข้อมูลของ HLA จำนวน 8 loci คือ HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5 และ -DQB1* ***ผลการศึกษา*** *จากการเปรียบเทียบพบว่าความสอดคล้องของผลการตรวจที่ได้ด้วยวิธี NGS กับผลการตรวจด้วยวิธี SBT และ PCR-SSP ที่ 98.33% และวิธี NGS สามารถระบุความละเอียดได้ 4-6 ตำแหน่งของ HLA alleles ผลที่คลุมเครือ สามารถเกิดขึ้นได้ในบางตำแหน่ง HLA เพราะชุด primers ของระบบนี้จะไม่ครอบคลุมในบาง exons ของแต่ละ HLA loci* ***สรุป*** *การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า NGS สามารถสรุปผลการตรวจได้ชัดเจนขึ้นในบาง HLA loci และช่วยลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการตรวจ HLA alleles โดยเฉพาะในกรณีที่ทำการทดสอบครั้งละ 10 ตัวอย่างพร้อมกัน*

คำสำคัญ : ● *HLA* ● *Next-generation sequencing (NGS)* ● *Sequence-based typing (SBT)*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:191-7.

Original Article

Analysis of HLA Typing by Next-Generation Sequencing from Proficiency Testing Data at Siriraj Hospital

Komon Luangtrakool, Duangporn Srinak, Rungrot Thongpradit, Sasijit Vejbaesya and Parichart Permpikul
Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract:

Background: *Method of identifying human leukocyte antigen (HLA) alleles has some evolved from serologically based methods to recently DNA-based methods. However, HLA typing has some limitations to discriminate alleles at a high-resolution level. Recent advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have enabled NGS as a proven alternative technique for sequence-based typing for characterization of the HLA alleles.* ***Objective:*** *To evaluate NGS of Roche Junior system (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA) by comparing the results*

ได้รับต้นฉบับ 25 กรกฎาคม 2559 รับลงตีพิมพ์ 24 สิงหาคม 2559

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ร.อ.หญิง ผศ. พญ.ปาริชาติ เพิ่มพิกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพรานนก แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 Email: parichart.per@mahidol.ac.th

with data obtained from proficiency testing. ***Materials and Methods:*** *HLA genotyping was performed using NGS on 10 proficiency samples that had previously been HLA typed by SBT and/or PCR-SSP techniques. The GS Junior Sequencer (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA) with Conexio Genomics ASSIGN ATF 454 HLA genotyping software analysis was used to analyze sequence variations at eight HLA loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5 and -DQB1).* ***Results:*** *The comparison of HLA typing results showed 98.33% concordance between NGS versus PCR-SSP and SBT methods. Moreover, the data obtained by NGS could provide 4-6 digits of HLA alleles. The genotyping ambiguities could still occur in some HLA loci because the primer sets of this system could not amplify in some exons.* ***Conclusion:*** *NGS could reduce the genotyping ambiguities of some HLA loci and cost effective for HLA typing, especially in simultaneous testing of ten samples in a single run.*

Keywords : ● *HLA* ● *Next-generation sequencing (NGS)* ● *Sequence-based typing (SBT)*

J Hematol Transfus Med 2016;26:191-7.

บทนำ

การตรวจ human leukocyte antigens (HLA) มีความสำคัญในการปลูกถ่ายอวัยวะเช่น ไตและไขกระดูก[1,2] ซึ่งวิธีการตรวจต้องมีความแม่นยำและถูกต้องเพื่อดูความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างผู้ให้และผู้รับให้มี HLA เหมือนกันมากที่สุด[3] ปัจจุบันวิธีการตรวจ HLA typing ที่สามารถตรวจชนิดได้ละเอียดและเป็นที่นิยมคือ การหาลำดับเบสดีเอ็นเอแบบ sequence-based typing (SBT)[4] โดยใช้หลักการของ Sanger (Sanger sequencing)[5,6] ซึ่งใช้วิธีการหาลำดับเบสที่เรียกว่า dideoxy หรือ chain termination[7] อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบจากการตรวจคือในบางครั้งเกิดความคลุมเครือ (ambiguity)[8,9] เช่น ในโมเลกุลดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมดอาจมีนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 ชนิดที่อยู่ในตำแหน่งนั้น ซึ่งจะต้องแยกให้ได้ว่านิวคลีโอไทด์ตัวไหนเป็นของอัลลีลใด[10] และการตรวจอาจต้องมีการหาลำดับเบสดีเอ็นเอในหลาย exon[11] จึงทำให้ใช้เวลาในการตรวจนานขึ้น ต่อมาจึงมีการพัฒนาและนำเอาวิธีการหาลำดับเบสแบบใหม่มาใช้ ซึ่งสามารถหาลำดับเบสในปริมาณที่มากกว่า (high-throughput)[3] และทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน (multiplexing)[12] อีกทั้งมีความไวในการตรวจ (high sensitivity)[13] ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า Next-generation sequencing (NGS)[4,13] สามารถใช้ในการหาลำดับเบสจำนวนมหาศาลได้รวดเร็วและแม่นยำขึ้น รวมทั้งต้นทุนในการดำเนินการมีราคาถูกลง จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้งานวิจัยทางจีโนมและพันธุศาสตร์อย่างหลากหลาย ได้มีการพัฒนามาใช้ในการตรวจทางด้าน HLA[14] เนื่องจากที่ยีนของ HLA มีความหลากหลายมากและการที่จะแยกให้ได้เป็น allele เดียวนั้นทำได้ยาก การใช้วิธี NGS จะช่วยการวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นจำนวนมากในเวลาเดียวกันและเป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว มีการเชื่อมอะแด็บเตอร์ชนิดพิเศษที่ปลายของสายดีเอ็นเอ[15] ทั้งนี้รายละเอียดรูปแบบของวิธีในแต่ละบริษัทจะมีความแตกต่างกัน เช่น มีความแตกต่างในเรื่องการเตรียมคลังดีเอ็นเอต้นแบบ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบส ความแตกต่างของข้อมูลความยาวลำดับเบสที่ได้และความถูกต้องของข้อมูลที่วิเคราะห์

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลการตรวจ HLA alleles โดยใช้เทคโนโลยีของ NGS ของบริษัท Roche ซึ่งใช้ระบบของ GS Junior system โดยเปรียบเทียบผลกับข้อมูลที่ได้จากการตรวจ HLA จากการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างดีเอ็นเอได้จากการเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) ของภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในโครงการ proficiency testing สำหรับการตรวจเอชแอลเอ เพื่อการจัดสรรอวัยวะ จัดโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2554 ถึง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 จำนวน 10 ตัวอย่าง เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีจำนวนน้อย ทำให้ได้ค่า power of discrimination เท่ากับ 50% (คำนวณจาก web site: http://osse.bii.a-star.edu.sg/calculation2.php) แต่การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นในการวิเคราะห์ข้อมูลและเป็นการศึกษาแบบ case series จึงใช้จำนวนตัวอย่างใน 10 รายนี้ซึ่งทราบผลการตรวจ HLA alleles ไว้ก่อนแล้ว

การแยกสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี salting-out โดยใช้สาร Guanidine-HCl (UCLA Tissue typing laboratory 1993, USA) ในการแยกสกัดดีเอ็นเอและตรวจ HLA โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP (One Lambda Inc., CA, USA) และวิธี SBT โดยใช้ in-house primers สำหรับการตรวจ HLA class I loci (HLA-A, -B และ -C) ส่วน HLA class II loci (HLA-DRB1, -DRB3/4/5 และ -DQB1) ตรวจด้วยวิธี PCR-SSP อย่างเดียว ผลของชนิด alleles แสดงใน Table 1 และ 2 ซึ่งมีผลการตรวจตรงกับผลของการทดสอบความชำนาญในโครงการ proficiency testing งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ตามรหัสโครงการเลขที่ 181/2557(EC4)

การตรวจชนิดของ HLA โดยวิธี next-generation sequencing

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA library) ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 5 ng/μL ปริมาตร 2 μL มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของแต่ละ exon โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ชุดน้ำยา 454 Sequencing (Roche Diag-

Table 1 HLA class I genotyping results for samples 1 to 10 by PCR-SSP and SBT and NGS techniques

Sample	PCR-SSP and SBT		NGS	
	HLA-A*		HLA-A*	
1	03:01	26:01	03:01	26:01
2	11:02	69:01	11:02	69:01
3	01:03	02:01	01:03	02:01
4	01:01	32:01	01:01	32:01
5	02:01	24:02/07	02:01	24:07
6	26:01	30:01	26:01	30:01
7	02:01	69:01	02:01:01	02:01:01
8	24:02	29:01	24:02	29:01
9	29:01	66:01	29:01	66:01
10	24:02	26:01	24:02	26:01
Sample	**HLA-B***		**HLA-B***	
1	46:01	47:01	46:01:01	47:01
2	27:04	27:05	27:04:01	27:05
3	08:01	46:01	08:01/18/39	46:01:01
4	35:01	57:01	35:01	57:01
5	15:17	52:01	15:17:01	52:01:01
6	08:01	42:02	42:02	42:02
7	40:01	52:01	40:01	52:01
8	07:05/06	27:06	07:05/06	27:06
9	07:05/06	50:01	07:05/06	50:01
10	27:06	40:01	27:06	40:01
Sample	**HLA-C***		**HLA-C***	
1	01:02	06:02	01:02:01	06:02:01
2	02:02	12:02	02:02:02	12:02:02
3	03:03	07:02	03:03:01	07:02:01
4	04:01	06:02	04:01:01	06:02:01
5	04:01	07:01	04:01:01	07:01:01
6	07:02	17:01	07:02:01	17:01:01
7	12:02	15:02	12:02:02	15:02:01
8	03:04	15:05	03:04:01	15:05
9	06:02	15:05	06:02:01	15:05
10	03:04	15:02	03:04:01	15:02:01

NGS = next-generation sequencing; PCR-SSP = polymerase chain reaction-sequence specific primer; SBT = sequence-based typing

Table 2 HLA Class II genotyping results for samples 1 to 10 by PCR-SSP and NGS techniques

Sample	PCR-SSP		NGS	
	HLA-DRB1*		HLA-DRB1*	
1	13:01	14:01/54	13:01	14:01/54
2	07:01	12:02	07:01:01	12:02:01
3	09:01	13:02	09:01:02	13:02:01
4	10:01	11:01	10:01:01	11:01
5	13:02	14:04	13:02:01	14:04
6	03:01	12:02	03:01	12:02:01
7	08:03	11:01	08:03:02	11:01
8	10:01	15:02	10:01:01	15:02:01
9	07:01	12:02	07:01:01	12:02:01
10	09:01	11:01	09:01:02	11:01
Sample	**HLA-DRB3/4/5***		**HLA-DRB3/4/5***	
1	3*01:01	3*02:02	3*01:01:02	3*02:02:01
2	3*02:02	4*01:03	3*02:02:01	4*01:01/03/06/08
3	3*03:01	4*01:03	3*03:01	4*01:01/03/06/08
4	3*02:02		3*02:02:01	
5	3*02:02	3*03:01	3*02:02:01	3*03:01
6	3*02:02	3*03:01	3*02:02:01	3*03:01
7	3*02:02		3*02:02:01	
8	5*01:08N		5*01:02/08N	
9	3*03:01	4*01:03	3*03:01	4*01:01/03/06/08
10	3*02:02	4*01:03	3*02:02:01	4*01:01/03/06/08
Sample	**HLA-DQB1***		**HLA-DQB1***	
1	06:03	05:02	06:03:01	05:02:02
2	02:02	03:01	02:02:01	03:01:01
3	03:03	06:04	03:03:02	06:04:01
4	03:01	05:01	03:01:01	05:01:01
5	05:03	06:04	05:03:01	06:04:01
6	02:01	03:01	02:01:01	03:01:01
7	03:01	06:01	03:01:01	06:01
8	05:01	05:01	05:01:01	05:01:01
9	02:02	03:01	02:02	03:01:01
10	03:01	03:03	03:01:01	03:03:02

NGS = next-generation sequencing; PCR-SSP = polymerase chain reaction-sequence specific primer

nostics, Indianapolis IN, USA) โดยชุด primers ได้แก่ GS GType HLA medium resolution (MR) และ GS GType HLA high resolution (HR) รายละเอียดแสดงใน Table 3 โดยที่ชุด primers ของ GS GType MR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ exons 2 และ 3 ของ HLA-A, -B และ -C และส่วนของ exon 2 ของ HLA-DQB1 และ HLA-DRB1, -DRB3/4/5 ส่วนชุด primers GS GType HLA HR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ exon 4 ของ HLA-A, B, C และ exon 3 ของ HLA-DQB1 มีการเชื่อมต่ออะแด็บเตอร์ที่ต่างกันที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอในระหว่างการทำ PCR แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ ชุด

Table 3 The GS GType HLA primer sets were used to sequence exons of HLA

GS Gtype MR Primer Set		GS Gtype HR Primer Set	
HLA	**Exon**	**HLA**	**Exon**
A	2, 3	A	4
B	2, 3	B	4
C	2, 3	C	4
DQB1	2	DQB1	3
DRB1, 3, 4, 5	2	DPB1	2
		DQA1	2

น้ำยา AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) หลังจากนั้นตรวจดูปริมาณและขนาดของ PCR products ที่ได้โดยใช้ชุดน้ำยา Quant-it PicoGreen dsDNA (Invitrogen, CA, USA) จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกเพิ่มปริมาณในหยดน้ำมันที่ประกอบด้วยสารสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อยู่ภายใน (emPCR amplification) โดยใช้ชุดน้ำยา GS Junior Titanium emPCR (Lip-A) เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR แล้วในหนึ่งหยดน้ำมันจะมีดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมือนกันติดอยู่ที่เม็ด bead จากนั้นนำเม็ด bead ที่ได้ผสมรวมกันทั้งหมดในทุกตัวอย่างซึ่งจะนำไปหาลำดับเบสโดยใช้ชุดน้ำยา GS Junior Titanium Sequencing และ PicoTiterPlate™ โดยใช้เครื่อง GS Junior Sequencer (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA) ซึ่งขั้นตอนวิธีทำทั้งหมดจะใช้ตาม GS Gtype HLA assay manual (454 Sequencing system, March 2012).

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลลำดับเบสแต่ละเส้นที่ได้จากเครื่อง GS Junior Sequencer ถูกนำออกมาในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ โดยใช้ไฟล์นามสุกล .fna มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Conexio Genomic ATF for 454 HLA typing (version 2.0, Australia) ได้ข้อมูลออกมาเป็น HLA alleles แล้วนำมาใช้การวิเคราะห์หาร้อยละของความสอดคล้องของแต่ละ HLA locus ได้แก่ HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5 และ HLA-DQB1 โดยเปรียบเทียบกับ ผลการตรวจของการทำ proficiency testing

ผลการศึกษา

จากผลการตรวจ HLA alleles ในตัวอย่างที่ 1 ถึง 10 (Table 1 และ 2) พบว่า การตรวจด้วยวิธี NGS สามารถบอกผล alleles ในระดับ high resolution สามารถทดสอบชนิดอัลลีลได้ 4 ถึง 6 digits เมื่อเทียบกับข้อมูลจากการตรวจโดยวิธี PCR-SSP และ SBT ในแต่ละ HLA-A locus พบว่าใน 10 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกัน 9 ตัวอย่าง แต่มี 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน คือ ตัวอย่างที่ 7 ตรวจได้ HLA-A*02:01 และ *69:01 ส่วนวิธี NGS ตรวจได้ HLA-A*02:01:01 allele เดียว สำหรับตัวอย่างที่ 5 วิธี NGS สามารถแยก HLA-A*24:07 จาก HLA-A*24:02 ได้ สำหรับการตรวจของ HLA-B locus พบว่าผลไม่สอดคล้องกันจำนวน 2 รายคือ ตัวอย่างที่ 6 วิธี PCR-SSP และ SBT ตรวจได้ HLA-B*08:01 และ *42:02 ส่วน วิธี NGS ตรวจได้ HLA-B*42:02 allele เดียวเท่านั้น ตัวอย่างที่ 3 วิธี NGS ไม่สามารถแยก HLA-B*08:01/18/39 ได้ นอกจากนี้ตัวอย่างที่ 8 และ 9 วิธี NGS ไม่สามารถแยก HLA-B*07:05 ออกจาก HLA-B*07:06 เช่นเดียวกับการตรวจด้วยวิธี PCR-SSP และ SBT

ในส่วนของ HLA-C, -DRB1, -DQB1 loci ผลการตรวจด้วยวิธี NGS ได้ผลสอดคล้องกันกับการตรวจด้วยวิธี PCR-SSP และ SBT และสามารถตรวจชนิด allele ได้เพิ่มถึง 6 digits ในหลายชนิด alleles แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับ HLA-DRB3/4/5 loci พบว่า ในตัวอย่างที่ 2, 3, 9 และ 10 วิธี NGS ไม่สามารถแยก HLA-DRB4*01:03 ออกจากกลุ่ม HLA-DRB4*01:01/03/06/08 ได้ และในตัวอย่างที่ 8 ไม่สามารถแยก HLA-DRB5*01:08N ออกจาก HLA-DRB5*01:02 ได้ เมื่อเปรียบเทียบผลตรวจทั้งหมดที่ได้จากวิธี PCR-SSP และ SBT กับ วิธี NGS มีความสอดคล้องกัน 98.33%

วิจารณ์

การคัดเลือกไขกระดูกจากผู้บริจาคเพื่อการปลูกถ่ายต้องใช้การตรวจชนิดของ HLA ที่ความละเอียดสูง สามารถตรวจได้ถึงระดับ alleles ขึ้นไป ทั้งนี้เพื่อช่วยในการคัดเลือก HLA ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคให้มีความเหมือนกันมากที่สุด ดังนั้นการตรวจยีนของ HLA ให้มีความละเอียดสูง และสามารถแยกเป็น allele เดียวได้ต้องอาศัยเทคนิค เครื่องมือและชุดน้ำยาตรวจ HLA ซึ่งปัจจุบันมีหลายบริษัทผลิตชุดน้ำยาตรวจจำหน่าย ซึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการตรวจของห้องปฏิบัติการต้องมีการทดสอบก่อนว่าผลการตรวจมีความน่าเชื่อถือและอ้างอิงได้ การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบวิธี NGS ซึ่งใช้เครื่องมือและชุดน้ำยาตรวจยีนของ HLA แต่มีข้อจำกัดคือ การตรวจโดยใช้วิธี NGS ในแต่ละครั้งจะมีราคาค่อนข้างสูงและต้องทำครั้งละ 10 ตัวอย่าง จึงได้เลือกทดสอบจาก 10 ตัวอย่างที่ทราบผลการตรวจ HLA แล้วจากการทำ proficiency testing ของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า HLA-A alleles ที่ตรวจได้โดยวิธี NGS ที่ได้ผลไม่สอดคล้อง 2 ราย คือตัวอย่างที่ 7 ที่วิธี NGS ตรวจได้ HLA-A *02:01:01 allele เดียว แต่ไม่พบ HLA-A* 69:01 เพราะ HLA-A *02:01 และ *69:01 มีความเหมือนกัน ในลำดับเบสที่อยู่ในส่วนของ exon 3 และ 4 แต่มีความแตกต่างกันในลำดับเบสที่อยู่ในส่วนของ exon 2 เมื่อเทียบกับข้อมูล IMGT/HLA Database (http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/) ซึ่งเมื่อดูจำนวนของข้อมูลลำดับเบสสายสั้นที่เรียกว่า reads ซึ่งเป็นข้อมูลที่บอกคุณภาพของการทำ NGS ในส่วนของ exon 2 พบว่า มีจำนวนน้อยมาก ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการแปลผลผิด จากการวิเคราะห์ของโปรแกรมได้[16] ในทำนองเดียวกันกับตัวอย่างที่ 6 ที่วิธี NGS ตรวจได้ HLA-B*42:02 allele เดียวไม่พบ HLA-B*08:01 อาจเกิดจากจำนวน reads ของ exon 2 น้อยเกินไป ส่วนตัวอย่างที่ 3 วิธี NGS ไม่สามารถแยก alleles 3 ชนิด คือ B*08:01, *08:18 และ

*08:39 ได้เพราะจำนวน reads ของ exon 2 น้อยเกินไปเช่นกัน ซึ่ง alleles ทั้งสามชนิดนี้มีความแตกต่างกันตรงส่วนนี้ สำหรับตัวอย่างที่ 8 และ 9 ไม่สามารถแยก HLA-B*07:05 ออกจาก HLA-B*07:06 เนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ใน exon 5 ซึ่งชุด primers ของ GS GType HLA HR และ MR ทำได้ตั้งแต่ exon 2 ถึง exon 4 จึงไม่ครอบคลุมถึง exon 5 และกรณีที่ตัวอย่างที่ 1 ไม่สามารถแยก HLA-DRB1*14:01 ออกจาก HLA-DRB1*14:54 ได้เนื่องจากความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ใน exon 3 ซึ่งชุด primers ของ HLA-DRB1 นี้ ทำเฉพาะ exon 2 จึงไม่ครอบคลุมถึง exon 3 จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความสอดคล้องของผลการตรวจ HLA alleles ทั้งหมด 98.33% ซึ่งเปรียบเทียบได้กับการศึกษาของ Mellet และคณะ[17] ซึ่งมีการศึกษาการตรวจ HLA alleles โดยวิธี PCR-SSP และ SBT เทียบกับ วิธี NGS ของบริษัท Roche และพร้อมนี้ได้ เปรียบเทียบวิธี Luminex และ PCR-SSP กับ NGS บริษัท Roche ด้วย ให้ผลความสอดคล้องที่ 98% ในทั้งสองกรณี จากการศึกษาของ Bentle และคณะ[16] พบความสอดคล้องที่ 99.4% เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธี SBT กับ วิธี NGS ในขณะที่การศึกษาของ Lind และคณะ[18] และ Moonsamy และคณะ[12] พบความสอดคล้องกันระหว่างวิธี SBT กับ วิธี NGS ที่ 100% ซึ่งผลของการศึกษาครั้งนี้ วิธี NGS ที่ใช้ศึกษา HLA alleles นั้นให้ผลสอดคล้องกันกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจประจำ

สำหรับราคาต้นทุนน้ำยาที่ใช้ในการตรวจซึ่งตรวจได้พร้อมกันทั้ง HLA class I และ class II ประมาณ 8,500 บาท ซึ่งมีต้นทุนที่น้อยกว่าประมาณ 0.5 เท่าของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจโดยวิธี PCR-SSP และสำหรับ HLA class II ได้รวมการตรวจ HLA-DQA1 และ -DBP1 ร่วมด้วยเพราะอยู่ในชุดตรวจเดียวกัน แต่ข้อมูลส่วนนี้ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ ควรต้องพิจารณาค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับต้นทุนของเครื่องมือและอุปกรณ์อื่น ซึ่งยังไม่มีข้อมูลในส่วนนี้ ขณะที่ต้นทุนในการตรวจวิธี SBT เฉพาะ HLA-A, -B และ -C ประมาณ 8,000 บาท (in-house primers) ซึ่งยังไม่รวมค่าตรวจ HLA class II ซึ่งราคาจะเพิ่มขึ้นอีก ปัจจุบันการตรวจ HLA โดยใช้เทคโนโลยี NGS มีหลายบริษัทกำลังพัฒนารูปแบบของเทคโนโลยีขึ้นใหม่อย่างต่อเนื่อง[3] ซึ่งรวมทั้งบริษัทที่ทำการศึกษาครั้งนี้ด้วย ที่ได้การผลิตเครื่องมือและน้ำยา เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสของยีน HLA ส่งผลให้ลดต้นทุนค่าตรวจและสามารถที่จะตรวจได้พร้อมกันในหลาย exons ทำให้มีผลการตรวจ HLA alleles มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

สรุป

การตรวจ HLA alleles ด้วยวิธี NGS สามารถตรวจ alleles ที่ระบุได้ 4 ถึง 6 digits ช่วยทำให้ลดปัญหาการรายงานผลไม่ชัดเจนใน HLA loci ได้แต่ยังมีข้อจำกัดที่ชุด primers ยังไม่ครอบคลุมถึงในบาง exons ทำให้ไม่สามารถแยก heterozygous alleles บางชนิดได้ อย่างไรก็ตามวิธี NGS สามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจได้ในกรณีที่ทำหลายตัวอย่างพร้อมกัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการตรวจ HLA alleles ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่างรวมทั้งงบประมาณ ปริมาณตัวอย่าง การระบุความละเอียดของ HLA alleles ที่ต้องการ รวมทั้งประสบการณ์ของบุคลากร เพื่อให้สามารถนำวิธีการตรวจนี้มาประยุกต์ใช้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท โรช ไดแอกโนสติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนน้ำยาและผู้เชี่ยวชาญ ห้องปฏิบัติการอณูพันธุศาสตร์ หน่วยอณูพันธุศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ และคณะทำงานโครงการ proficiency testing สำหรับการตรวจ เอชแอลเอ เพื่อการจัดสรรอวัยวะ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะและศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ช่วยจัดเตรียมตัวอย่างและข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. *Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Okudaira Y, Kikkawa E, Oka A, et al. HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing. Tissue Antigens 2014;83:10-6.*
2. *Danzer M, Niklas N, Stabentheiner S, Hofer K, Proll J, Stuckler C, et al. Rapid, scalable and highly automated HLA genotyping using next-generation sequencing: a transition from research to diagnostics. BMC Genomics 2013;14:221.*
3. *Lange V, Bohme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schone B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. BMC Genomics 2014;15:63.*
4. *Voorter CE, Palusci F, Tilanus MG. Sequence-based typing of HLA: An improved group-specific full-length gene sequencing approach. Methods Mol Biol 2014;1109:101-14.*
5. *Smith LK. HLA typing by direct DNA sequencing. Methods Mol Biol 2012;882:67-86.*
6. *Lazaro A, Tu B, Yang R, Xiao Y, Kariyawasam K, Ng J, et al. Human leukocyte antigen (HLA) typing by DNA sequencing. Methods Mol Biol 2013;1034:161-95.*
7. *Mrazek F, Onderkova J, Ambruzova Z, Zachova S, Petrek M. A novel HLA-DRB1 allele, HLA-DRB1*13:116, identified by sequencing-based typing in a member of the Czech national marrow donor registry. Int J Immunogenet 2013;41:149-50.*

8. *Hajeer AH, Al Balwi MA, Aytul Uyar F, Alhaidan Y, Alabdulrahman A, Al Abdulkareem I, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in Saudis using next generation sequencing technique. Tissue Antigens 2013;82:252-8.*
9. *Hosomichi K, Jinam TA, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. BMC Genomics 2013;14:355.*
10. *Niklas N, Proll J, Danzer M, Stabentheiner S, Hofer K, Gabriel C. Routine performance and errors of 454 HLA exon sequencing in diagnostics. BMC Bioinformatics 2013;14:176.*
11. *Holcomb CL, Rastrou M, Williams TC, Goodridge D, Lazaro AM, Tilanus M, et al. Next-generation sequencing can reveal in vitro-generated PCR crossover products: some artifactual sequences correspond to HLA alleles in the IMGT/HLA database. Tissue Antigens 2014 ;83:32-40.*
12. *Moonsamy PV, Williams T, Bonella P, Holcomb CL, Hoglund BN, Hillman G, et al. High throughput HLA genotyping using 454 sequencing and the Fluidigm Access Array System for simplified amplicon library preparation. Tissue Antigens 2013;81:141-9.*
13. *Wirtz C, Sayer D. Data analysis of HLA sequencing using Assign-SBT v3.6+ from Conexio. Methods Mol Biol 2012;882:87-121.*
14. *Gabriel C, Furst D, Fae I, Wenda S, Zollikofer C, Mytilineos J, et al. HLA typing by next-generation sequencing-getting closer to reality. Tissue Antigens 2014;83:65-75.*
15. *Trachtenberg EA, Holcomb CL. Next-generation HLA sequencing using the 454 GS FLX system. Methods Mol Biol 2013;1034: 197-219.*
16. *Bentley G, Higuchi R, Hoglund B, Goodridge D, Sayer D, Trachtenberg EA, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. Tissue Antigens 2009;74:393-403.*
17. *Mellet J, Gray CM, Pepper MS. HLA typing: Conventional techniques v. next-generation sequencing. S Afr Med J 2016;106: 88-91.*
18. *Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, Heron S, Rogers M, Slavich L, et al. Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. Hum Immunol 2010;71:1033-42.*