นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียม เอชแอลเอ -เอ และ เอชแอลเอ -บี แอนติซีรั่ม สำหรับตรวจหาชนิดของ เอชแอลเอ ในคนไทย

เพ็ญศิริ ฮิมหมั่นงาน และ กาญจนา สุจิรชาโต*

*สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400, *ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อ ศูนย์การแพทย์สิริกิติ์ โรงพยาบาลรามาธิบดี ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400*

บทคัดย่อ: *ทำการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีต่อ HLA class I ในซีรั่มจำนวน 464 ตัวอย่างจากหญิงไทยตั้งครรภ์ ที่มาฝากครรภ์โรงพยาบาลราชวิถี โดยทดสอบกับลิมโฟซัยต์ที่ทราบชนิดของ HLA -A, -B antigen จำนวน 60 ราย ด้วยวิธี microlymphocytotoxicity ลิมโฟซัยต์เหล่านั้นมี HLA antigen ซึ่งครอบคลุม HLA -A, HLA -B antigen ที่พบบ่อยในคนไทย*

ซีรั่ม 36 ใน 464 ราย สามารถจำแนกชนิดของ HLA class I antibodies และให้ปฏิกิริยาแรง (เซลล์ตาย 80-100%) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ R-value) มากกว่า 0.7 สามารถใช้เป็น typing sera ได้ ในจำนวนนี้เป็น monospecific HLA antibody 23 ราย มีความจำเพาะ 9 ชนิด ประกอบด้วย anti-HLA -A2 9 ราย, anti-HLA -A24 2 ราย, anti-HLA -B7 4 ราย, anti-HLA -B44 1 ราย, anti-HLA -B13 1 ราย, anti-HLA -B58 1 ราย, anti-HLA-B35 2 ราย, anti-HLA -B46 2 ราย และ anti-HLA -Bw6 1 ราย ส่วนอีก 10 ราย เป็น multispecific HLA antibodies

ประโยชน์ของการเตรียม HLA typing sera ครั้งนี้ไม่เพียงแต่ใช้ตรวจหาชนิดของ HLA -A, -B antigens ที่จำเพาะเชื้อชาติเท่านั้นหากยังใช้ในการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ HLA กับการเกิดโรคในคนไทยและเป็นแนวทางนำไปสู่การตรวจด้วยวิธี HLA DNA typing ต่อไปด้วย

อย่างไรก็ตามชนิดของ HLA antibody ที่ได้ ยังไม่ครอบคลุม HLA specificity ทั้งหมดที่พบในคนไทย จำเป็นต้องสั่งซื้อ HLA antibody เพิ่ม เพื่อใช้ในการเตรียม HLA -A, -B typing tray ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ขึ้น

Key Words : *● Anti-sera for HLA -A and HLA -B ● Thais*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543;10:41-9.

HLA typing sera เป็นซีรั่มที่มี HLA antibodies จำเพาะต่อ HLA antigen ชนิดต่างๆ เช่น HLA -A, HLA -B, HLA -DR antigen เป็นต้น แหล่งของแอนติซีรั่มที่มี HLA antibodies พบได้ในหญิงที่เคยตั้งครรภ์มาแล้วหลายครั้ง ผู้ป่วยที่เคยได้รับเลือดบ่อยครั้ง และผู้ป่วยที่เคยได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ (allotransplanted patients) แต่ HLA antibodies ที่ได้รับจากหญิงตั้งครรภ์มักเป็น monospecific ที่สามารถนำมาใช้เป็น

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 8 พฤษภาคม 2543 และให้ตีพิมพ์ 31 พฤษภาคม 2543
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นาง เพ็ญศิริ ฮิมหมั่นงาน สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

typing sera ได้ดีที่สุด[1,2] และเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัด

HLA (human-leukocyte antigen) เป็นระบบแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว ที่มีความหลากหลายมาก (polymorphism) การสร้าง HLA ถูกกำหนดโดยกลุ่มของยีน major histocompatibility complex บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6[3] มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน[4] แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (class I gene) ประกอบด้วย ยีนที่ควบคุม allele ต่างๆ บน locus HLA -A, HLA -B และ HLA -C ทำหน้าที่ในการกำกับการสังเคราะห์โมเลกุลของ HLA class I (HLA -A, HLA -B และ HLA -C) ซึ่งพบอยู่บนเซลล์ที่มีนิวเคลียสเกือบทุกชนิดทั่วร่างกาย และมีความสำคัญเกี่ยวกับ cytotoxicity T - cell response[5-9] กลุ่มที่ 2 (class II gene) กำกับการสร้าง HLA class II (HLA -DR, HLA -DQ และ HLA -DP) พบบนผิวเซลล์ของ B-lymphocytes และบน antigen-presenting cell เช่น macrophages กลุ่มที่ 3 (class III gene) เกี่ยวข้องกับระบบคอมพลีเมนต์ (complement system)

HLA เป็นระบบที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการปลูกถ่ายอวัยวะ[10] การได้รับเลือด และส่วนประกอบของเลือดโดยเฉพาะเกร็ดเลือด[8] การพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก[11] นิติเวชวิทยา[11] การศึกษาหลักฐานทางมนุษยวิทยา[12] และความสัมพันธ์กับการเกิดโรค[13,14]

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคต่างๆ กับระบบ HLA มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง[15] ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคได้อย่างลึกซึ้ง ตลอดจนสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัย และเลือกแนวทางในการรักษาและป้องกันได้

การศึกษา HLA class I antigens โดยอาศัย serological method นั้น typing sera เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด typing sera ที่ดีควรจะเป็น monospecific sera และจะต้องให้ปฏิกิริยาบวกแรง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลลบเท็จ ที่จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผล typing sera ที่ดีควรจะเป็นแอนติบอดีที่ได้จากชนชาติเดียวกัน ตรวจหาได้โดยใช้ panel cell จากชนชาติเดียวกัน เพื่อความถูกต้องแน่นอนในการแปลผลแอนติเจน ทั้งนี้เพราะ HLA antigen มีความแตกต่างตามเชื้อชาติ[16] ในการเตรียม HLA typing sera ครั้งนี้เตรียมจาก panel cell ที่ได้จากประชากรเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ซึ่งครอบคลุม HLA -A, -B antigen ที่พบในคนไทย[17] และสามารถใช้สำหรับตรวจหา HLA -A, -B antibodies ในซีรั่มของหญิงตั้งครรภได้[18] และคัดเลือกซีรั่มที่มีคุณภาพเหมาะสมมาใช้เป็น HLA typing sera เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HLA กับการสาเหตุการเกิดโรคที่พบมากในคนไทยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างซีรั่มได้จากหญิงตั้งครรภ์จำนวน 464 ราย ที่มาฝากครรภ์ที่คลินิกฝากครรภ์ โรงพยาบาลราชวิถี ระหว่างเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2539 อายุระหว่าง 17-44 ปี (เฉลี่ย 28.1 ปี) อย่างน้อยครรภ์ที่สองและมีอายุครรภ์มากกว่า 3 เดือน โดยเจาะเลือดจากหญิงไทยตั้งครรภ์ รายละประมาณ 10 mL ปั่นแยกซีรั่มใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 400 ไมโครลิตร สำหรับนำมาศึกษา ซีรั่มที่เหลือเก็บใส่ tube ขนาด 2 mL และ 1 mL แช่แข็งไว้ที่ -80°C

2. ลิมโฟซัยต์ที่ทราบชนิดของ HLA antigen (panel) ได้จากผู้บริจาคโลหิตที่ธนาคารเลือด โรงพยาบาลราชวิถี และอาสาสมัครจากเจ้าหน้าที่ ของสถาบันพยาธิวิทยา และสถาบันโรคผิวหนัง จำนวน 60 ราย เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ รายละประมาณ 10 mL โดยใช้ acid citrate dextrose (ACD) เป็นสารกันเลือดแข็ง (anticoagulant) ผ่านขบวนการปั่นแยกให้ได้ลิมโฟซัยต์ แล้วนำมาตรวจหาชนิดของ HLA class I antigen โดยใช้ HLA class I serotyping tray จากโครงการเตรียมน้ำยา ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทย-

ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล หรือ HLA-ABC typing tray ของบริษัท One Lambda ประเทศสหรัฐอเมริกา คัดเลือก panel cell 60 ราย ให้มีชนิดของ HLA antigen ครอบคลุมแอนติเจนที่พบในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ[17] ซึ่งประกอบด้วย HLA antigen ใน Locus A 6 ชนิด คือ HLA -A2, A11.1, A11.2, A24, A33 และ A74 HLA antigen ใน Locus B 21 ชนิด คือ HLA -B51(5), B52(5), B7, B44(12), B13, B62(15), B75(15), B77(15), B57(17), B58(17), B54(22), B55(22), B56(22), B27, B35, B60(40), B61(40), B46, B48, Bw4, Bw6 รวม 27 ชนิด

3. วัสดุและน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน microlymphocytotoxicity test[19,20]

วิธีการ

1. เตรียม screening tray

นำ microtest-plate ชนิด 60 wells/tray มาหยด mineral oil ด้วย automatic oiler หรือ jet pipet และหยดซีรั่มที่ต้องการตรวจหา HLA antibodies ลงในแต่ละหลุมๆ ละ 1 ไมโครลิตร (ให้หลุมที่ 1A เป็น negative control และหลุมที่ 1B เป็น positive control) แล้วนำไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะทำการทดสอบ [ในการทดสอบครั้งนี้มีซีรั่ม 464 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก 290 ราย (5 trays) ทดสอบกับ panel 60 ราย รวม 300 trays กลุ่มที่สอง 174 ราย (3 trays) ทดสอบกับ panel 30 ราย รวม 90 tray ที่ใช้ panel cell 2 กลุ่ม เนื่องจากเจาะเลือดจากหญิงตั้งครรภ์ 464 รายนั้น ได้แบ่งเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกเก็บซีรั่ม 290 ราย ทำการทดสอบกับ panel cells 30 cells แรก ช่วงที่สองเก็บซีรั่ม 174 ราย ทำการทดสอบกับ panel ใหม่ อีก 30 cells ในขณะเดียวกันก็ได้นำซีรั่มกลุ่มแรก (290 ราย) มาทำการทดสอบกับ panel cell ชุดที่ 2 โดยทำพร้อมกับซีรั่มกลุ่มที่ 2 (174 ราย) เพื่อเป็นการยืนยัน]

2. เตรียมลิมโฟซัยต์ (panel cells)

แยกลิมโฟซัยต์ โดยใช้น้ำยา Isoprep (Ficoll-Hypaque) ถ.พ. 1.077 โดยวิธี density gradient centrifugation ดูดชั้น interface มาล้างด้วยน้ำเกลือ (normal saline) ตรวจสอบ viability ของเซลล์โดยใช้สี trypan blue เซลล์ที่นำมาใช้ต้องมี viability สูงกว่า 90% แล้วจึงปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 2,000-2,500 cell/mm^3 ด้วยน้ำยา McCoy's 5A

3. ขบวนการทดสอบ microlymphocytotoxicity test

3.1 นำ screening tray ออกจากตู้แช่แข็งมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.2 นำลิมโฟซัยต์ที่ปรับความเข้มข้นแล้วหยดลงใน screening tray ด้วยเครื่อง lambda jet หลุมละ 1 ไมโครลิตร (หรือ soft-drop techique) incubate เซลล์กับซีรัมที่อุณหภูมิห้อง (22-25°C) 30 นาที

3.3 เติม rabbit complement ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (soft drop technique) incubate ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 60 นาที

3.4 เติมสี 5% Eosin Y ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (soft-drop technique) เพื่อย้อมเซลล์ประมาณ 2 นาที

3.5 เติม 40% neutral formalin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อ fix และหยุดปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์ settle นานประมาณ 1 ชั่วโมง เติม mineral oil และปิดด้วย cover slips ขนาด 50 x 75 mm.

3.6 อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast ใช้กำลังขยาย 100-150 เท่า ตรวจดูร้อยละของเซลล์ตาย ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเดิมติดสีทึบหมด ต่างจากเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งมีลักษณะเซลล์วาว ขนาดเล็ก เลือกซีรัมที่ให้ความแรงปฏิกิริยา 8 (80-100% เซลล์ตาย)

4. วิธีการวิเคราะห์แอนติบอดีของระบบ HLA[21]

วิเคราะห์หาความจำเพาะของแอนติบอดีในระบบ HLAโดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ R-value) จากตาราง 2x2 เพื่อช่วย

บอกความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี ว่ามีความจำเพาะกันหรือไม่มากน้อยเพียงใด ค่า R-value ที่ดีจะอยู่ใกล้ 1

correlation coefficient (R-value)

$$= \frac{ad - bc}{\sqrt{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}}$$

ผลการตรวจวิเคราะห์

ซีรั่ม 464 ราย ตรวจพบ HLA -A, -B แอนติบอดีย์ที่ให้ปฏิกิริยา (คะแนน 8) จำนวน 72 ราย (ตารางที่ 1) คิดเป็นร้อยละ 15.5 ซีรัมชุดแรก 290 ราย ได้ทดสอบกับ panel cell ชุดที่ 1 และ 2 รวม 60 เซลล์ พบ HLA -A, -B แอนติบอดีย์ 53 ราย (ปฏิกิริยาแรงคะแนน 8) จำแนกเป็น monospecific 24 ราย ประกอบด้วย anti-HLA -A2 จำนวน 8 ราย, anti-HLA -A11 3 ราย, anti-HLA -B51 1 ราย, anti-HLA -B7 3 ราย, anti-HLA -B44 1 ราย, anti-HLA -B35 1 ราย, anti-HLA -B46 2 ราย, anti-HLA -B77 1 ราย, anti-HLA -B58 1 ราย, anti-HLA -Bw4 1 ราย และ anti-HLA -Bw6 2 ราย เป็น multispecific 13 ราย ที่เหลือ 16 ราย เป็น unidentified, typing sera ที่มี R-value มากกว่า 0.7 มี 24 ราย (ตารางที่ 2) ซีรั่มชุดที่ 2 จำนวน 174 ราย ที่ทดสอบกับ panel cell ชุดที่ 2 จำนวน 30 เซลล์ พบ HLA -A, -B antibodies 19 ราย จำแนกเป็น monospecific 9 ราย ประกอบด้วย anti-HLA -A2 2 ราย, anti-HLA -A11 2 ราย, anti-HLA -A24 2 ราย, anti-HLA -B7 1 ราย, anti-HLA -B13 1 ราย และ anti-HLA -B35 1 ราย ที่เหลือเป็น multispecific 5 ราย และ unidentified 5 ราย typing sera ที่มี R-value มากกว่า 0.7 มี 9 ราย (ตารางที่ 3) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้พบ monospecific antisera ซึ่งมีจำนวน 33 รายใน 464 ราย คิดเป็น 7.11 และ multispecific antisera มี 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.88 (ตารางที่ 4) แต่สามารถนำมาใช้เป็น typing sera จำแนกได้เป็น monospecific 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.96 และ multispecific อีก 10 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.16

ตารางที่ 1 Type of HLA -A, -B antibodies from 464 Thai pregnant women

HLA specificity	No of sera
Monospecific	
A2	9
A11.1	5
A24	2
B51 (5)	1
B7	4
B44 (12)	1
B13	1
B77 (15)	1
B58 (17)	2
B35	2
B46	2
Bw4	1
Bw6	2
Multispecific	18
Unidentified	21
Total	**72**

( ) = Board HLA specificity

วิจารณ์

จากการศึกษา HLA class I antibody ที่ได้จากหญิงตั้งครรภ์มีร้อยละ 15.5 ใกล้เคียงกับรายงานอื่นๆ[22-26] ในหญิงตั้งครรภ์หลายครั้งพบได้ร้อยละ 15-20[22] และพบได้มากขึ้นถึงร้อยละ 20-30 ในหญิงตั้งครรภ์ที่ 2 และ 3[23] ใกล้เคียงกับรายงานของ พิมล เชี่ยวศิลป์ และคณะ[24] คือพบ HLA class I antibodies ร้อยละ

ตารางที่ 2 HLA -A, -B antisera obtained from 1st set sera

HLA specificity	No of serum	R- value of each antibody
Monospecific		
Anti-A2	20	0.90
	29	0.78
	75	0.93
	96	0.93
	119	0.82
	121	0.87
	137	0.72
	140	0.86
Anti-B7	150	1.00
	180	0.81
	205	0.77
Anti-B44	48	1.00
Anti-B58	253	0.79
Anti-B35	14	0.71
Anti-B46	157	0.83
	163	0.81
Anti-Bw6	279	0.75
Multispecific		
Anti-B51+Anti-B52	22	0.81, 0.81
Anti-A24+Anti-B51	36	0.73, 0.75
Anti-B62+Anti-B75+Anti-B35	85	0.78, 0.70, 0.80
Anti-B7+Anti-B55	182	0.59, 0.85
Anti-B7+Anti-B55	192	0.78, 0.86
Anti-B51+Anti-B52+Anti-B35	232	0.78, 0.92, 0.94
	237	0.91, 0.70, 0.85
Total	24	

Antisera with R-value > 0.7 were presented

20.83 หรือรายงานของ ปรียาจิต เจริญวงศ์ และคณะ[25] ร้อยละ 14.4 และ Payne พบร้อยละ 17[26]

Monospecific antisera ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม antisera ที่มีคุณสมบัติดีที่สุด ให้ปฏิกิริยาแรง (เซลล์ตาย 80-100%) พบรวมทั้งสิ้น 33 ราย ใน 464 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.11 ซึ่งสูงกว่ารายงานของ พิมล เชี่ยวศิลป์ และ

ตารางที่ 3 HLA -A, -B antisera from 2nd set sera

HLA specificity	No of serum	R-value of each antibody
Monospecific		
Anti - A2	359	0.86
Anti - A24	303	0.91
	459	0.89
Anti - B7	315	0.85
Anti -B13	375	0.75
Anti -B35	425	0.75
Multispecific		
Anti-B51+Anti-B75+AntiB55	365	0.67, 0.74, 0.60
Anti-B7+Anti-B55	391	0.75, 0.68
Anti-B51+Anti-B52	435	1.00, 1.00
Total	**9**	

Antisera with R-value > 0.7 were presented

ตารางที่ 4 R - values of HLA class I antibodies from 464 Thai pregnant women

R - values of HLA antibody	No of sera	Percentage
1. Monospecific antibody	33	7.11
1.1 High R- value (≥ 0.8)	15	3.23
1.2 Medium R- value (≥ 0.7)	8	1.72
1.3 Low R- value (< 0.7)	10	2.16
2. Multispecific antibody	18	3.88
2.1 High R- value (≥ 0.8)	7	1.51
2.2 Medium R- value (≥ 0.7)	3	0.65
2.3 Low R- value (< 0.7)	8	1.72
3. Unidentified (R value < 0.5)	21	4.53
Total	**72**	**15.52**

คณะ[24] (4.38%) และรายงานของปรียาจิต เจริญวงศ์ และคณะ[25] (2.03%) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก panel cell ที่ใช้ทราบชนิดของ HLA antigen มากกว่าสมัยก่อนทำให้พบแอนติบอดีย์ได้มากขึ้นแต่เมื่อคำนวณค่า R-value แล้ว monospecific typing sera จะมีเพียง 23 รายเท่านั้น อย่างไรก็ตาม HLA -A2 เป็น monospecific antibody ที่พบมากที่สุดเช่นเดียวกับสองรายงานดังกล่าวข้างต้น

Multispecific antisera พบ 10 รายที่มีค่า R-value มากกว่า 0.7 สามารถนำมาใช้เป็น typing sera ได้ แต่ทั้ง monospecific antisera และ multispecific antisera ก่อนนำมาใช้เป็น typing sera ต้องทดสอบกับ panel cell ที่จำเพาะจำนวนเพิ่มขึ้น หรือส่งไปวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการ HLA อื่นๆ เพื่อการยืนยัน

Unidentified antisera คือกลุ่มซีรั่มที่ให้ผลบวกแต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นแอนติบอดีชนิดใด อาจเกิดจาก panel cell ที่ใช้วิเคราะห์เป็น blank หรือ unknown antigen ที่ยังไม่มี typing sera สำหรับตรวจสอบได้ หรือเกิดจาก non-HLA antibody panel cell ที่ให้ blank มี 11 ราย locus A 9 ราย locus B 2 ราย

โดยสรุปแล้ว HLA antibody ที่สามารถนำมาใช้เป็น HLA -A, -B typing sera มี 33 ราย ประสิทธิภาพของ typing sera มี 2 ระดับโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ หรือ R-value ในการจำแนก คือ

1. Anti-sera ที่มีประสิทธิภาพสูง R-value มากกว่าเท่ากับ 0.8 จำนวน 22 ราย เป็น monospecific 15 ราย และ multispecific 7 ราย

2. Anti-sera ที่มีประสิทธิภาพปานกลาง R-value มากกว่าเท่ากับ 0.7 แต่ต่ำกว่า 0.8 จำนวน 11 ราย เป็น monospecific 8 ราย และ multispecific 3 ราย

แอนติซีรั่มที่ได้ทั้งหมดประมาณ 80 มิลลิลิตร (~ 2 mL/sample) เมื่อประเมินราคาซื้อในปี พ.ศ. 2542 (ค.ศ. 1999) จะมีมูลค่าประมาณ 320,000 บาท (สามแสนสองหมื่นบาท) เมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการคัดกรองเบื้องต้น และจำแนกชนิดของ HLA antibody ของซีรั่ม 464 ราย เป็นเงิน 201,400 บาท ซึ่งดูเหมือนว่าถูกกว่า หากแต่ก่อนที่จะนำมาใช้เป็น typing sera ต้องทดสอบกับ cell ที่รู้ชนิดมากขึ้นและเพิ่มจำนวนซีรั่มต้นทุนอาจจะสูงขึ้น อีกทั้งปัจจุบันนี้เทคนิค HLA DNA typing ได้ถูกนำมาใช้มากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความสัมพันธ์กับโรค เนื่องจากสามารถจำแนก sub group ได้ด้วย ดังนั้นประโยชน์ของการเตรียม HLA -A, -B typing sera นี้ จึงใช้ตรวจหาชนิดของ HLA antigen ในคนไทยทั้งคนปกติและศึกษาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่การตรวจด้วยเทคนิค HLA DNA typing ต่อไป

อย่างไรก็ตามชนิดของ HLA antibody ที่ได้ยังไม่ครอบคลุม HLA specificities ทั้งหมด ที่พบในคนไทยยังขาด antibody อีกหลายชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่มี phenotype frequency ต่ำ หาได้ยาก บน locus A 9 ชนิด และ locus B อีก 18 ชนิด รวม 27 ชนิด จำเป็นต้องนำ antibody ที่ได้บางส่วนแลกเปลี่ยนกับ HLA antibody อื่นๆ ที่ยังขาดกับห้องปฏิบัติการอื่นในประเทศ หรือซื้อเพิ่มเติมเฉพาะตัวที่ยังขาด และไม่สามารถแลกเปลี่ยนกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ก่อนนำมาใช้เป็น antisera ควรได้ทดสอบกับเซลล์จำนวนหลายชุด รวมแล้วไม่ควรน้อยกว่า 100 เซลล์ เพื่อให้มีความมั่นใจในความจำเพาะจึงใช้ในการเตรียม HLA -A, -B typing tray ให้ครบถ้วนสมบูรณ์ขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลหลายฝ่ายที่มีส่วนสนับสนุนให้การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จนสามารถเผยแพร่ได้ คือ พญ.วิจิตรา เหมศรีชาติ ผู้อำนวยการสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, คณะบริหารงานวิจัย, กองคลัง, กรมการแพทย์ และสำนักงบประมาณ, หัวหน้ากลุ่มงานสูตินรีเวช, นายจำลอง ทองย้อย เจ้าหน้าที่เจาะเลือดห้องฝากครรภ์ โรงพยาบาลราชวิถี, นางสาวนุสรณ์ พูลสิงห์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์การแพทย์ ห้องปฏิบัติการอิมมูโนโลยี

เอกสารอ้างอิง

1. Cepellini R, Rood JJ Van. The HLA system I genetics and molecular biology. Semin Hematol 1974;11:233-51.
2. Walker RH. Technical manual. 10th ed. Arlington, VA. Am Assoc Blood Banks. 1990:249-67.
3. Breuning MH, Vanden Berg Loonen EM, Bernini LF. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. Hum Genet 1977;37:131-9.
4. Dewolf WC, Dupont B, Yunis EJ. HLA and disease: current concepts. Human Pathol 1980;11:332-7.
5. Mould JM, Fawcett KJ, Garner RJ, eds. Scientific and technical aspects of the major histocompatibility complex. Arlington, VA. Am Assoc Blood Banks 1989:23-6.
6. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of HLA-A, B, C, antigen in normal human organs. Transplantation 1984;38:287-92.
7. Bishop GA, Hall BM, Suranyi MG, Tiller DJ, Horrath JS, Duggin GG. Expression of HLA antigens of renal tubular cells in culture supernatants and gamma interferon increase both class I and class II HLA antigens. Transplantation 1986;42:671-9.
8. Duqnesnoy RJ, Filip DJ, Tomasulo PA, Aster RH. Role of HLA-C matching in histocompatible platelet transfusion therapy allo-immunized thrombocytopenic patients. Transplant Proc. 1977;9:1827-8.
9. Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC restricted cytotoxic T-cell. Adv Immunol 1979;27:51-177.
10. Carpenter CB. The major histocompatibility gene complex. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, eds. Harrison Principles of Internal Medicine. 13th ed. New York: McGraw Hill 1994:380-2.
11. Walker RH, Myers MA, Phillips LM. The probability of exclusion of the HLA -A, -B system in North American Whites and Blacks in parentage tests. Transfusion 1987;27:75-9.
12. Dyer P, Middeleton D, eds. Histocompatibility Testing. A practical approach. London: Oxford University Press. 1993:107-42.
13. Dawkins RL, Christiansen FT, Kay PH, et al. Disease associations with complotypes supratypes and haplotypes. Immunol Rev 1983;70:5-22.
14. Tiwari JL, Terasaki PI. HLA antigen associated with diseases. In: HLA and disease associations, springvereag. New York, 1985:32-48.
15. Svejgaard A, Ryder LP. Associations between HLA and disease. In: Dausset LJ, Svejgaard A, eds. HLA and Disease. Copenhagen: Munksgaard, 1977:46-53.
16. Buar MP, Danilovs JA. Population Analysis of HLA -A, B, C, DR and other genetic markers. In: Terasaki PI, eds. Histocompatibility testing 1980. UCLA tissue typing Laboratory Los Angeles: UCLA 1980: 955-93.
17. Romphruk A, Burusrux S, Chintana P, Urwijitaroon Y, Romphruk A, Leelayuwat C. Distribution of HLA -A and -B Antigens in Northeastern Thais. J Med Assoc Thai 1996;79:732-6.
18. Himmungan P, Sujirachato K. HLA -A and HLA-B antigens in Bangkok Thais. J Med Tech Phy 1998;10: 117-23.
19. Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, et al. Microdroplete testing for HLA -A, B, C, and D antigen. Am J Clin Pathol 1978;69:109-20.
20. Schiebl B. HLA typing techniques. HLA-typing problem and solution. Biotest AG. special edition No.7. Munich, Germany. 1987:15-23.
21. Herbert S. HLA Reagent Serum Screening. Tissue Typing Reference Manual. South-Eastern organ Procurement Foundation Richmond, Virginia. 3rd ed. 1993.
22 One Lambda HLA Technical manual. HLA Antibodies. HLA Basic Technical Workshop Canoga Park CA. 1997:80.
23. Terasaki PI, Mickcy MR, Yamazaki JN. Maternal-fetal incompatibility: incidence of HLA antibodies and possible association with congenital anomalies. Transplantation 1970;9:538-43.
24. Chiewsilp P, Chanarat P, Pongsathaporn S, et al. The Occurrence of lymphocytotoxins in pregnant women. J Med Assoc Thailand 1979;62:59-63.
25. Charoenwongse P, Bhutharamongkol N, Limtrakarn J, et al. The HLA antibodies in Thai pregnant women at Siriraj Hospital. South-East Asian J Trop Med 1979;10:207-8.
26. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibilities. J Clin Invest 1958;37:1756-63.

Preparation of HLA -A and HLA -B Antisera for HLA Typing in Thais

Pensiri Himmungan, and Kanchana Sujirachato*

Department of Medical Services, Institute of Pathology, Rajvithi Road, Rajthevee, Bangkok 10400, Thailand,
**Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory, Sirikit Medical Centre, Ramathibodi Hospital, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand*

Abstract: *Four hundred and sixty four sera were collected from pregnant Thai women who attended prenatal clinic at Rajavithi Hospital. These sera were screened for HLA -A, -B antibody specificity by standard microlymphocytotoxicity test using panel lymphocytes which covered HLA -A and HLA -B antigen specificities commonly found in Thais.*

Thirty-six out of 464 sera were strongly positive and could be identified for HLA class I antibody specificity. There were 23 monospecific sera [representing 9 HLA specificities i.e ; 9 cases of anti-HLA-A2, 2 cases of anti-HLA-A24, 4 cases of anti-HLA-B7, 1 case of anti-HLA-B44 (12), 1 case of anti-HLA-B13, 1 case of anti-HLA-B58, 2 cases of anti-HLA-B35, 2 cases of anti-HLA-B46 and 1 case of anti-HLA-Bw6]. The R-value of these HLA antibody specificities were greater than 0.7. The other 10 sera were multispecific HLA antisera.

To our benefit this project is not only racially specific HLA typing sera for typing of HLA -A, -B antigens but it could be also used for preliminary study of disease and HLA association in Thais leading to the study using HLA DNA typing technique. However, the HLA antibody specificities of HLA typing sera obtained were not covered every HLA specificity in Thais. Some HLA antibody specificities have to be purchased to make a complete HLA -A, -B typing tray.

Key Words : ● *Anti-sera for HLA -A and HLA -B* ● *Thais*

Thai J Hematol Transf Med 2000;10:41-9.

ในโลกมีแต่คนบ้า

โลกนี้มี แต่คนบ้า น่าใจหาย
เพราะมีอยาก เป็นฐานล่าง จนวางวาย
มีให้บ้า มากมาย จนวายปราณ
บ้าเรื่อยเปื่อย บ้ากินกาม และบ้าเกียรติ
หรือมีใคร เคยเกลียด ลองว่าขาน
บวกหรือลบ บ้าเกินบ้า ทุกอาการ
ดีหรือชั่ว มัวซมซาน บ้าปานกัน
ในโลกนี้ จึงมีแต่ คนบ้า
ถ้าไม่จริง มาต่อว่า เอากะฉัน
จะได้บ้า กันต่อไป ให้พัลวัน
ได้บ้ากัน ต่อไป ในจักรวาล
อันความยาก นั้นครอบงำ คนทั่วไป
ใครไม่อยาก ได้อะไร ลองไขขาน
อันความอยาก เป็นความบ้า ทุกอาการ
ดีหรือพาล ก็คือบ้า มาด้วยกัน
อันความอยาก มีว่อน แต่อ้อนออก
อยากนมแม่ ไม่ต้องบอก ให้ใครขัน
อยากอะไร ใจระบม จมคืนวัน
เมืองสวรรค์ ก็ยังอยาก เป็นปากปลิง
บ้าสวรรค์ พิษฉมัง ยังไม่รู้
จึงได้บ้า กันอยู่ เป็นผีสิง
บ้าตนเอง เป็นคนบ้า น่าชังชิง
บ้าอย่างยิ่ง คือบ้าตัว ของตัวเอง.

พุทธทาสภิกขุ
๑๖ กุมภาพันธ์ ๒๕๓๖