นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยเทคนิค พีซีอาร์เอสเอสพี

อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, กมลทิพย์ นิลคุปต์*, ภัสรา อาณัติ, ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช และ ชฎารัตน์ จารุชัยมนตรี****

ภาควิชาพยาธิวิทยา, *ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า, **ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ: *เป็นที่ทราบกันดีว่า human leukocyte antigen (HLA) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ankylosing spondylitis, โรคข้อ และโรคมะเร็งของเม็ดเลือดบางชนิด ดังนั้นการตรวจหาแอนติเจน HLA-B27 จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อช่วยในการวินิจฉัยสาเหตุของโรคที่แท้จริง ทำให้แพทย์สามารถทำการรักษาได้อย่างถูกต้อง โดยทั่วไปการตรวจหา HLA-B27 ทำได้โดยวิธีทางซีโรโลยีซึ่งต้องใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมาทำการทดสอบ เซลล์ที่ใช้ทดสอบต้องเป็นเซลล์ใหม่และต้องใช้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะครอบคลุมต่อแอนติเจนของ HLA-B27 ครบทุกอัลลีล ทำให้เป็นข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธีซีโรโลยี ปัจจุบันบริษัทต่างประเทศได้ผลิตน้ำยาที่ใช้เทคนิค polymerase chain reaction with sequence-specific primer (PCR-SSP) มาทำการทดสอบ ซึ่งให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำกว่าวิธีทางซีโรโลยี แต่มีราคาแพงทำให้ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอสเอสพี โดยทำการทดสอบ HLA-B27 ในตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจ HLA-B27 ด้วยวิธีซีโรโลยี โดยใช้แอนติซีรัมของบริษัทจากต่างประเทศ แล้วจึงนำตัวอย่างเลือดที่เหลือมาทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอสเอสพี โดยได้ดัดแปลง primers ให้เหมาะสมและครอบคลุมกับ HLA-B27 ทุกอัลลีล เจ้าหน้าที่ที่ทำการทดสอบจะไม่ทราบผลของการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีมาก่อน ผลการศึกษาพบว่าในตัวอย่างตรวจ 311 รายให้ผลบวกต่อ HLA B27 ตรงกัน 61 ราย และให้ผลบวกด้วยวิธีซีโรโลยีอย่างเดียว 61 ราย ในขณะที่ให้ผลบวกด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี 63 ราย เมื่อกำหนดให้วิธีทางซีโรโลยีเป็นวิธีมาตรฐานพบว่าวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี มี sensitivity 96.83%, specificity 100%, positive predictive value 100%, negative predictive value 99.20% และ accuracy 95.96% ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การตรวจ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพีนั้น เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และราคาต้นทุนของน้ำยาถูกกว่าน้ำยาที่นำเข้าจากต่างประเทศ*

Key Words: ● *HLA-B27* ● *PCR-SSP* ● *Microlymphocytotoxicity test*

เวชสารแพทย์ทหารบก 2547;57:11-18.

เป็นที่ทราบกันดีว่า human leukocyte antigen (HLA) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิด ทั้งในแง่ของการทำให้เกิดโรค (disease susceptibility genes) และการป้องกันการเกิดโรค (disease protection genes) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HLA-B27 พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรค ankylosing spondylitis (AS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในประชากรทุกเชื้อชาติ[1-10] กลไกของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับ HLA มีสมมติฐานได้หลายแบบ อาทิเช่น โมเลกุลของ HLA เป็น receptor ต่อ organism ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาต่อกันจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเสียไป หรือโมเลกุลของ HLA บนผิวของ lymphocyte คล้ายคลึง (cross reaction) กับลักษณะของ organism ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ไม่มีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อ organism เหล่านั้น หรือโมเลกุลของ HLA ถูก organism ที่ทำให้เกิดโรค

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 18 ธันวาคม 2546 ได้ให้ตีพิมพ์เมื่อ 15 มกราคม 2547

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พ.อ.หญิง รศ.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้ไม่สามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันได้ตามปกติ แอนติเจนของ HLA เป็นปัจจัยหนึ่งร่วมกับปัจจัยอื่นๆ เช่น สิ่งแวดล้อม เชื้อโรค ซึ่งทำให้เกิด susceptibility ต่อการเกิดโรค[8]

นอกจาก HLA-B27 จะเป็นแอนติเจนบนผิวของเม็ดเลือดขาวที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค AS แล้ว ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคอื่นอีกหลายชนิด เช่น โรคข้อ โรคมะเร็งทางระบบโลหิตวิทยาบางชนิด รวมทั้งโรคเยื่อบุตาอักเสบ[8,11,12] ดังนั้น การตรวจหาแอนติเจน HLA-B27 จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อช่วยในการวินิจฉัยสาเหตุของโรคที่แท้จริง ทำให้แพทย์สามารถทำการรักษาได้อย่างถูกต้อง โดยทั่วไปการตรวจหา HLA-B27 ทำได้โดยวิธีทางซีโรโลยี[13,14] ได้แก่ microlymphocytotoxicity technique (LCT) ซึ่งใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดลิมโฟซัยท์ของผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อแอนติเจน โดยมีคอมพลีเมนต์ร่วมอยู่ด้วย ปัจจัยที่สำคัญของการทดสอบนี้คือเซลล์ที่จะใช้ทดสอบต้องเป็นเซลล์ใหม่มีอายุไม่เกิน 24 ชม. และต้องใช้แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะครอบคลุมต่อแอนติเจนของ HLA-B27 ครบทุกอัลลีล ทำให้เป็นข้อจำกัดของการทดสอบด้วยวิธีซีโรโลยี นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี isoelectric focusing และ flow cytometry หรือการตรวจหา soluble HLA antigenซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ น้ำยามีราคาแพงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ และต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ที่มีประสบการณ์และความชำนาญ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจหาอัลลีลของ HLA เช่น PCR with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR with sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) และ PCR with sequence-specific primer (PCR-SSP)[15-19]

วิธี PCR-SSP เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาอัลลีลของ HLA ทั้ง A, B และ DR ซึ่งใช้เวลาในการทำการทดสอบประมาณ 2 ชั่วโมง จึงเป็นข้อดีของการใช้วิธีนี้ เพราะใช้เวลาในการตรวจน้อย และขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก อีกทั้งได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ ไม่แตกต่างจากวิธี PCR ชนิดอื่น[18,19] ปัจจุบันมีบริษัทต่างประเทศผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปโดยวิธี PCR-SSP มาจำหน่าย ร่วมกับการตรวจทางซีโรโลยี ซึ่งพบว่าการตรวจด้วยวิธี PCR-SSP ให้ผลถูกต้องแม่นยำมากกว่าวิธีซีโรโลยี เนื่องจากเป็นการตรวจระดับยีน แต่มีราคาแพงยังไม่เหมาะในการนำมาใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการประจำในประเทศไทยหรือประเทศที่กำลังพัฒนา จึงควรมีการพัฒนาชุดทดสอบขึ้นใช้เอง เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อน้ำยาจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยเทคนิค พีซีอาร์เอสเอสพี

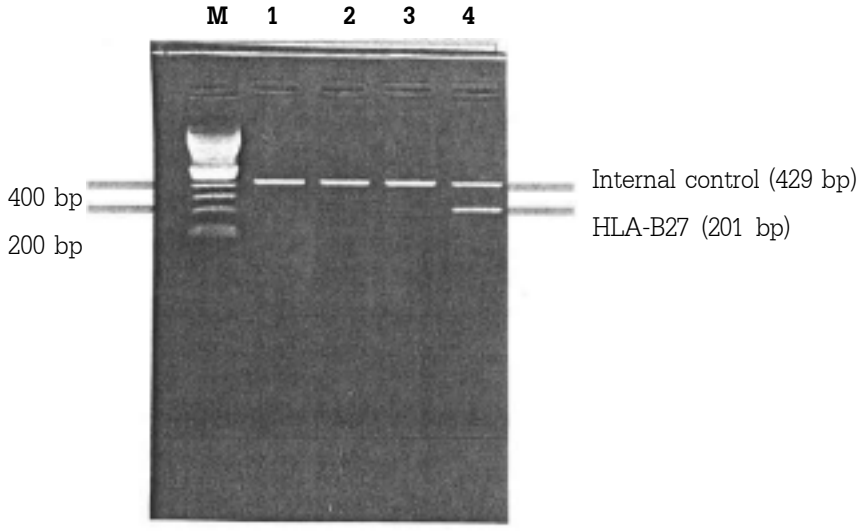
ตัวอย่างตรวจและวิธีการศึกษา

กลุ่มประชากรเป้าหมาย ได้แก่ เลือดของผู้ป่วยที่ส่งตรวจหา HLA-B27 ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ตั้งแต่ มกราคม ถึง ธันวาคม 2546 จำนวน 311 ตัวอย่าง โดยได้รับอนุมัติให้ใช้เลือดในส่วนที่เหลือจากการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี ซึ่งภาควิชาพยาธิวิทยาให้การบริการเป็นประจำอยู่แล้ว นำเลือดส่วนที่เหลือมาเตรียม DNA โดยใช้วิธี Salting out (Pel-Freez DNA isolation kit, Pel-Freez, WI, USA) โดย DNA ที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้นระหว่าง 50-200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

วิธีซีโรโลยี[21]

นำ HLA-B27 typing trays ซึ่งได้ใส่แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อ HLA-B27, negative และ positive controls ไว้แล้วหลุมละ 1 ไมโครลิตร จากตู้แช่แข็ง -30°ซ มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว (2,000 เซลล์/ไมโครลิตร) มาหยดลงใน HLA-B27 typing trays โดยใช้ single dispensing syringe ขนาด 50 ไมโครลิตร หยดเซลล์หลุมละ 1 ไมโครลิตร Incubate ส่วนผสมของเซลล์และซีรัมนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น หยด 5 ไมโครลิตร ของ rabbit complement ทุกหลุมแล้ว incubate ต่อไปนาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา หยด 10 ไมโครลิตรของสี Stain fix (One Lambda, Inc., CA USA) ลงไปทุกหลุมเพื่อย้อมเซลล์และหยุดปฏิกิริยา

อ่านผลปฏิกิริยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast โดยเทียบดูจากเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายซึ่งมีลักษณะบวม ขนาดใหญ่ ติดสีทึบ ในขณะที่เซลล์มีชีวิตจะมีขนาดเล็ก วาว และไม่ติดสี กรณีที่ HLA-B27 ให้ผลบวก จะพบเซลล์ตายมากกว่า 80%ในหลุมทดสอบที่มีแอนติซีรัมที่จำเพาะกับ HLA-B27



รูปที่ 1 ผลการตรวจ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์ เอสเอสพี
Lane 1-3 คือ HLA-B27 negative
Lane 4 คือ HLA-B27 positive
M คือ 100 bp DNA ladder

และ positive control กรณี HLA-B27 ให้ผลลบ จะไม่พบเซลล์ตายมากเกินกว่า 10% ในหลุมทดสอบที่มีแอนติซีรัมที่จำเพาะกับ HLA-B27 และ negative control

วิธีพีซีอาร์ เอสเอสพี

ได้ออกแบบ primers ที่จำเพาะต่อ HLA-B27 โดยศึกษาจาก sequences ของ IMGT/HLA Database (http://www3.ebi.ac.uk/Services/imgt/hla/cgi-bin/align.cgi) ซึ่ง primers ต่อ HLA-B27 (B*2701-2725) นี้จะสามารถ amplified regionของ HLA-B27 ตรงตำแหน่งของ exon 2 ที่ได้ product size 201 bp และ internal control primers จะจำเพาะต่อ human growth hormone gene ที่ได้ product size 429 bp[20] ส่วนผสมของการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย 8 ไมโครลิตร ของ 20 mM Tris pH 8.8, 20 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA, 160 μM dNTP, 1 pmol B27 specific primers, 2 pmol control primers, 0.5 U Taq DNA polymerase และ 2 ไมโครลิตร ของ gel loading dye (60% sucrose และ 1 mM cresol red)[22] นำส่วนผสมดังกล่าวมา 9.5 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร แล้วเติมตัวอย่าง DNA 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดให้สนิท แล้วนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในเครื่อง Thermal cycler 3 ชนิด คือ PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research, Inc, MA, USA), iCycler (Biorad, USA) และ GeneAmp PCC System 2400 (Perkin Elmer, NJ, USA) โดยมีโปรแกรมดังนี้ 95°ซ นาน 5 นาที; 95°ซ นาน 45 วินาที และ 72°ซ นาน 1 นาที จำนวน 2 รอบ; 95°ซ นาน 45 วินาที, 60°ซ นาน 45 วินาที และ 72°ซ นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ; 72°ซ นาน 7 นาที รวมเวลาทั้งสิ้นประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ amplified products มา run gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ใน 1X TBE buffer เวลาในการ run electrophoresis ที่ 100 โวลต์ นาน 20 นาที เมื่อครบเวลาถ่ายรูป band จาก gel ที่ได้ ซึ่งในกรณีที่ให้ผลบวกต่อ HLA-B27 จะพบ positive band (fast migrating) ขนาด 201 bp ร่วมกับ internal control band (slow migrating) ขนาด 429 bp สำหรับกรณีที่ให้ผลลบต่อ HLA-B27 จะพบแต่เฉพาะ internal control band เท่านั้น ดังรูปที่ 1 นอกจากนี้

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

เพื่อเป็นการยืนยันว่าปฏิกิริยาพีซีอาร์ เอสเอสพี เกิดขึ้นสมบูรณ์ จะต้องพบ internal control band ในทุกการทดสอบ หากไม่พบแสดงว่าการทดสอบไม่ถูกต้อง

ผลการศึกษา

ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่นำมาศึกษามีจำนวนทั้งหมด 311 ราย ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจ HLA-B27 ด้วยวิธีซีโรโลยีกับวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี พบว่าให้ผลบวกต่อ HLA-B27 ตรงกัน 61 ราย (19.61%) โดยให้ผลบวกด้วยวิธีซีโรโลยีอย่างเดียว 61 ราย ในขณะที่ให้ผลบวกด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี 63 ราย สำหรับตัวอย่างเลือดที่ให้ผลไม่ตรงกันทั้ง 2 รายนี้ ได้นำไปทดสอบเพิ่มเติม โดยใช้น้ำยา Dynal Classic SSP HLA-B27 " low resolution" (Dynal Biotech Ltd., Wirral, UK) พบว่าให้ผลบวกทั้ง 2 รายและเพื่อยืนยันผลการทดสอบ ได้นำตัวอย่าง DNA ทั้ง 2 รายไปทำการตรวจโดยใช้ DNA sequencing พบว่าเป็น HLA-B*27 alleles ทั้ง 2 ราย เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี กับวิธีซีโรโลยี พบว่าวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี มี sensitivity 96.83%, specificity 100%, positive predictive value 100%, negative predictive value 99.20% และ accuracy 95.96% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี จำนวน 311 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 3 ชนิด คือ PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research, Inc, MA, USA), iCycler (Biorad, USA) และ GeneAmp PCC System 2400 (Perkin Elmer, NJ, USA) พบว่าได้ผลตรงกันทั้งหมด

อีกทั้งเพื่อเป็นการศึกษา reproducibility ของการทดสอบ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพีโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่เตรียมขึ้นเอง กับตัวอย่าง DNA ที่ได้ทำการทดสอบไว้แล้ว 30 ราย (โดยวิธีสุ่มตัวอย่าง) พบว่าให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง และได้ศึกษาความไวของการเกิดปฏิกิริยาโดยเจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01, 0.1, 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่า จะเกิด amplified products ของ control และ specific primers ได้ตั้งแต่ ความเข้มข้นของ DNA เท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่ปฏิกิริยาจะชัดเจนในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

วิจารณ์

โดยทั่วไปการตรวจหา HLA-B27 นิยมใช้วิธีทางซีโรโลยี ซึ่งสามารถรายงานผลได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องทำการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด และต้องใช้เลือดเป็นปริมาณมากประมาณ 10 มล. และมีค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อแอนติซีรัมจากต่างประเทศ และอาจไม่มีความจำเพาะครอบคลุมต่อแอนติเจนของ HLA-B27 ครบทุกอัลลีล จึงทำให้มีการพัฒนาการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ เพื่อให้การทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำขึ้น[15-19] เทคนิค พีซีอาร์เอสเอสพี เป็นวิธีซึ่งนิยมใช้ในการตรวจประจำ ห้องปฏิบัติการ HLAส่วนใหญ่จะจัดซื้อน้ำยาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง การศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอสเอสพี ขึ้นใช้เองโดยออกแบบ primers ให้ครอบคลุมกับ HLA-B27 ได้ทุกอัลลีล (B*2701-2725) ในขณะที่น้ำยาจากต่างประเทศ

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการตรวจหา HLA-B27 โดยวิธีซีโรโลยี และวิธีพีซีอาร์เอสเอสพีในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย 311 ราย

	PCR-SSP		Total
LCT	**Positive**	**Negative**	
Positive	61	0	61
Negative	2	248	250
Total	63	248	311

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

บางบริษัทยังไม่สามารถตรวจได้ครอบคลุมทุกอัลลีลโดยใช้ HLA-B27 primers เพียงคู่เดียว ถ้าต้องการให้ตรวจได้ครบทุกอัลลีล จะต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมกับ primers คู่อื่น การศึกษาครั้งนี้ ได้เปรียบเทียบวิธีพีซีอาร์เอสเอสพีกับวิธีทางซีโรโลยี จากจำนวนตัวอย่างทดสอบ 311 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกตรงกันทั้ง 2 วิธี 61 ราย สำหรับตัวอย่าง 2 ราย ซึ่งให้ผลบวกกับวิธีพีซีอาร์ เอสเอสพี อย่างเดียว เมื่อตรวจยืนยันด้วยน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ ก็ให้ผลบวกตรงกันทั้ง 2 ราย และเมื่อศึกษาด้วยการ sequencing พบว่าเป็น B*27 alleles สาเหตุที่ทำให้เกิดผลลบปลอมจากการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี อาจเกิดมาจากไม่มีแอนติซีรัมที่จำเพาะกับอัลลีลนั้น หรืออัตราส่วนของเซลล์และแอนติซีรัมไม่เหมาะสม หรือส่วนผสมไม่เข้ากันดี ปฏิกิริยาอ่อน ทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้[20,21]

ข้อดีของการทดสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ คือใช้เลือดจำนวนน้อย ไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบทันทีและความไวของปฏิกิริยาก็เกิดได้ดี[16-20,23] สำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยวิธีพีซีอาร์เอสเอสพี ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความไวของปฏิกิริยาเกิดได้ชัดเจนเมื่อ DNA มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 นี้ยังมีต้นทุนค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบราคากับน้ำยาจากต่างประเทศ โดยเมื่อคำนวณค่าใช้จ่ายน้ำยาที่จัดซื้อทั้งหมดต่อการทำการทดสอบ 1 ครั้ง จะมีต้นทุนต่ำกว่าราคาจากต่างประเทศ 50 เท่า ทำให้ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของผู้ป่วย อีกทั้งยังช่วยลดการนำเข้าน้ำยาจากต่างประเทศซึ่งมีผลต่อเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ

ดังนั้นชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบ HLA-B27 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เอสเอสพี นี้ จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจประจำและใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปของห้องปฏิบัติการ HLA ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมูลนิธิโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่แผนกจุลชีววิทยา กองวิจัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมแพทย์ทหารบกที่ช่วยในการตรวจ DNA sequencing และเจ้าหน้าที่กองพยาธิวิทยา โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าที่ช่วยในการเก็บสิ่งส่งตรวจ

เอกสารอ้างอิง

1. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson GM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. N Engl J Med 1973;288:704-6.
2. Brewerton DA, Cafferey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock DD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. Lancet 1973;2:904-7.
3. Darby SC, Doll R, Gill SK, Smith PG. Long term mortality after a single treatment course with x-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. Br J Cancer 1987;115:320-2.
4. Au WY, Hawkins BR, Cheng N, Lie AKW, Liang R, Kwong YL. Risk of hematological malignacies in HLA-B27 carriers. Br J Haematol 2001;115:320-2.
5. Solow H, Higalgo R, Singal DP. Juvenile-onset diabetes: HLA-A, -B, -C, -DR alloantigens. Diabetes 1979;28:1-4.
6. Good AE, Kawanishi H, Schultz JS. HLA B27 in blacks with ankylosing spondylitis or Reiter's disease. N Engl J Med 1976; 1294:166-7.
7. Sengupta S, Sehgal S, Aikat BK, Deodbar SD, James DCO. HLA B27 in ankylosing spondylitis in India. Lancet 1977;1: 1209-10.
8. Caughey DE, Gow J. Ankylosing spondylitis in Polynesian races. NZ Med J 1975;81:268.
9. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Dieye A, Lopez-Larrea C. HLA-B27 alleles and susceptibility and resistance to ankylosing spondylitis (AS). In: Charron D ed. vol II: HLA. Genetic diversity of HLA functional and medical implication. Paris, EDK, 1997:648-51.
10. Tiwari JL, Terasaki PI: Mechanism of HLA and disease associations. In: Tiwari JL, Terasaki PI eds. HLA and disease associations. New York Springer-Verlag, 1985:28-31.
11. Christiansen F, Zilko P, Dawkins RL. Ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive individuals: use in diagnosis. Br Med J 1979; 6156:125.
12. Bandilla K, Berg D, Semmler U, Pfannenstiel P. HLA B27 determination for differential diagnosis of chronic back pain. Verh Dtsch Ges Rheumatol 1978;5:369-71.
13. Terasaki PI, Bernoco D, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigen. Am J Clin Pathol 1978;69:103-20.
14. Pei R, Arjomand-Shamsai M, deng CT, Cesbron A, Bignon JD, Lee JH. A monospecific HLA-B27 fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody for rapid, simple and accurate HLA-B27 typing. Tissue Antigens 1993;41:200-3.
15. Neumuller J, Schwartz DWM, Dauber E, Mayr WR. Evaluation for four monoclonal antibodies against HLA-B27 for their reliabi-

lity in HLA-B27 typing with flow cytometry (FC): comparison with the classic microlymphocytotoxic test (MLCT). Cytometry 1996;26:209-15.

16. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Greenwood BM, McMichael AJ. HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and an African B27 subtype. Lancet 1991;337:640-2.
17. Dominguez O, Coto E, Martinez-Naves E, Choo SY, Lopez-Larrea C. Molecular typing of HLA-B27 alleles. Immunogenetics 1992;36:277-82.
18. Inoko H. PCR-RFLP method holds great promise for complete HLA class II genotyping. Tissue Antigens 1990;36:88-92.
19. Olerup O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification. Tissue Antigens 1994;43:253-6.
20. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR 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 transplantaion. Tissue Antigens 1992;39:225-35.
21. Milken SL. Reagent antisera for HLA typing. Tissue typing reference manual South-Eastern Organ Procurement Foundation, 2nd ed. Virginia, 1987:1-11.
22. Hoppe BL, Conti-Tronconi BM, Horton RM. Gel-Loading dyes compatible with PCR. Biotechniques 1992;12:679-80.
23. Schaffer M, Olerup O. HLA-AB typing by polymerase-chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. Tissue Antigens 2001;58:299-307.

Development of the HLA-B27 Test Kit by the PCR-SSP Technique

Oytip Nathalang, Kamolthip Nillakupt*, Pasra Arnutti, Srisurang Tantimavanich**

and Chadarat Jaruchaimontree**

Department of Pathology, *Department of Biochemistry, Phramongkutklao College of Medicine, **Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Background: *An association between HLA-B27 and ankylosing spondylytis, rheumatic diseases and hematologic malignancies has been proven. Therefore, typing for the individual alleles of the HLA-B27 group is important in diagnosis and treatment. HLA laboratories have traditionally typed for HLA-B27 by serological technique, which requires fresh viable lymphocytes and the availability of antisera. Typing trays must be made specifically for HLA-B27 allele testing, which is a limitation of this technique. Presently, there is a commercial kit of PCR with sequence specific primers (PCR-SSP) and it provides more accurate results than serological technique. However, its price is relatively high for laboratories with limited funds in Thailand and other developing countries.* ***Objective:*** *To develop the HLA-B27 test kit by the PCR-SSP technique.* ***Methods:*** *Three hundred and eleven blood samples, which were tested for HLA-B27 by microlymphocytotoxicity test (LCT), using commercial antisera were included in this study. To increase the validity and reliability of the evaluation, the laboratory technicians were blinded for the LCT results. The PCR-SSP testing for HLA-B27 was developed, as described by Olerup O with some modifications.* ***Results:*** *It was found that 61(19.61%) and 63 (20.26%) of these samples were positive for HLA- B27 by LCT and PCR-SSP, respectively. The sensitivity and specificity of the PCR-SSP were 96.83% and 100%, respectively, when using LCT as the standard method. The PCR-SSP positive predictive value was 100%, the negative predictive value was 99.20% and accuracy was 95.96%.* ***Conclusion:*** *This study shows that the PCR-SSP is simple, convenient and a more cost-effective in-house test kit.*

Key Words: ● *HLA-B27* ● *PCR-SSP* ● *Microlymphocytotoxicity test*

RTA Med J 2547;57:11-18.

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

พระธรรมคือสิ่งศักดิ์สิทธิ์ที่แท้จริง 3

เราจงปฏิบัติต่อพระเจ้า คือ กฎของอิทัปปัจจยตาให้ถูกต้องในลักษณะอย่างนี้, เราก็มีพระธรรม พระธรรมจริง ไม่ใช่พระธรรมปลอม ไม่ใช่กระดาษ ไม่ใช่ใบลานเอาไว้ ทำรังหนู แล้วไหว้ ๆ ๆ ๆ แล้วก็ว่าช่วย ๆ ๆ ๆ. ปฏิบัติธรรม คือ ปฏิบัติถูกต้องตามกฎของอิทัปปัจจยตา อันเป็นธรรมะสูงสุดที่พระพุทธเจ้าก็ยอมเคารพ, สิ่งที่พระพุทธเจ้ายอมเคารพนั่นแหละ เราเอามาปฏิบัติ แล้วมันก็ช่วยพร้อมกันไปในตัว, ฉะนั้น ถ้าใครสวด กาเยน วาจาย อ เจตสา วา แล้วระวังให้ดี ๆ นะ มันจะเป็นไสยศาสตร์ไปไม่ทันรู้นะ. ขอให้แน่ลงไปว่าเราทำถูกต้องแล้ว แล้วท่านก็ช่วยพร้อมกันไปในตัว, ครั้งแรกถ้าอยากอ้อนวอน ก็อ้อนวอนด้วยการพยายามปฏิบัติให้ดีที่สุด ให้ตรงตามเรื่องของท่าน. ถ้าเราจะอ้อนวอน ถ้าเราจะขอร้องเราจะต้องปฏิบัติให้ถูกตรงตามกฎของพระธรรม แล้วท่านก็จะช่วยในทันที พระธรรมที่ปฏิบัตินั่นแหละจะช่วยพร้อมกันไปทันทีไม่ต้องรอ, ที่เรียกว่า อกาลิโก หมายความว่าอย่างนี้ พอปฏิบัติก็ได้ผลทันทีไม่ต้องรอ.

พุทธทาสภิกขุ