

การพัฒนาวิธีการตรวจยีน HLA-B*15:02 ด้วยเทคนิค Real-time PCR ในผู้ป่วยสถาบันประสาทวิทยา ที่ได้รับยา Carbamazepine เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผื่นแพ้ยาชนิดกลุ่มอาการ Steven-Johnson Syndrome (SJS) และ Toxic Epidermal Necrolysis (TEN)

ปัทมพงศ์ ใจกลม วท.ม.

กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ สถาบันประสาทวิทยา แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

Development of a Real-time PCR Assay of HLA-B*15:02 Allele for Prevention of Carbamazepine Induced Steven Johnson Syndrome/ Toxic Epidermal Necrolysis in Neurological Institute of Thailand

Patthamaphong Jaiklom, M.Sc.

Department of Medical Technology, Neurological Institute of Thailand, Thung Phayathai, Ratchathewi, Bangkok, 10400, Thailand

Corresponding Author: Patthamaphong Jaiklom (E-mail: patthamaphong.jai@gmail.com)

(Received: 11 September, 2023; Revised: 18 March, 2024; Accepted: 26 September, 2024)

Abstract

Background: Steven Johnson Syndrome (SJS) and Toxic epidermal necrolysis (TEN) are severe adverse drug reactions (ADR) that increase the morbidity and mortality. Most are hospitalized for a long period of time. This causes high treatment costs and possibly requires continuous treatment after being discharged from the hospital. Therefore, HLA-B*15:02 detection before drug dispensing can help physicians in selecting therapeutic drugs to prevent ADR or drug allergies in patients. **Objectives:** The researcher aimed at developing a real-time PCR assay for detection of HLA-B*15:02. **Methods:** EDTA whole blood samples were collected from 76 patients during 2022-2023, extract for DNA and screened for HLA-B*15:02 gene using the real-time PCR with in-house designed primers and probes specific for HLA-B*15:02 gene according to the HLA databases. Then, we compared the result of our developed real-time PCR assay with Sanger gene sequencing for HLA-B*15:02 gene genotyping. **Results:** In this study we found 29 positive HLA-B*15:02 (38.15%) and 47 negative HLA-B*15:02 were samples (61.85%) The sensitivity and specificity of this developing method were 100% and 100%, respectively. All samples were compared with Sanger sequencing and all results showed similar to sanger sequencing. **Conclusion:** This study was successful developed assay for detecting HLA-B*15:02 allele to prevent CBZ-induced SJS/TEN.

Keywords: HLA-B* 15:02, Real-time PCR, Steven-Johnson Syndrome (SJS), Toxic epidermal necrolysis (TEN), Carbamazepine

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: กลุ่มอาการสตีเวนจอห์นสัน (Steven-Johnson syndrome; SJS) และกลุ่มอาการ toxic epidermal necrolysis (TEN) คืออาการแพ้ยาหรืออาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่รุนแรงและอาจทำให้ผู้ที่แพยามีโอกาสพิการหรือเสียชีวิตมากถึงร้อยละ 30 ผู้ที่มีอาการแพ้ยาส่วนใหญ่จะได้รับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน มีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงและต้องรักษาต่อเนื่องหลังจากออกจากโรงพยาบาลเป็นเวลาหลายเดือน ส่งผลให้มีภาระด้านรายจ่ายจากการรักษาโรคที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการตรวจหา ยีน HLA-B*15:02 ก่อนการจ่ายยาสามารถช่วยแพทย์ในการเลือกยารักษาโรคเพื่อป้องกัน ADR หรือการแพ้ยาในผู้ป่วย

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจหา ยีน HLA-B*15:02

วิธีการ: เก็บตัวอย่างเลือดในหลอด EDTA 76 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่แพทย์สั่งให้ตรวจคัดกรองยีน HLA-B* 15:02 สกัดดีเอ็นเอและใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบเฉพาะสำหรับยีน HLA-B*15:02 จากฐานข้อมูล HLA เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีการหาลำดับเบส Sanger gene sequencing เพื่อที่จะหาปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา ยีน HLA-B* 15:02

ผล: ในการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบยีน HLA-B* 15:02 จำนวน 29 ตัวอย่างจากทั้งหมด 76 ตัวอย่าง ในขณะที่ 47 ตัวอย่างให้ผลการตรวจเป็นลบ คิดเป็นร้อยละ 38.15 และ 61.85 ตามลำดับ เปรียบเทียบผลของตัวอย่าง 29 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ วิธี Sanger gene sequencing พบว่าให้ผลเหมือนกันกับวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้น โดยมีค่าความไวและความจำเพาะอยู่ที่ร้อยละ 100

สรุป: การศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาชุดตรวจ ยีน HLA-B*15:02 allele เพื่อป้องกันการเกิดผื่นแพ้ SJS/TEN ก่อนได้รับการรักษาด้วยยา carbamazepine

คำสำคัญ: HLA-B*15:02, เรียลไทม์พีซีอาร์, กลุ่มอาการสตีเวนจอห์นสัน, กลุ่มอาการ toxic epidermal necrolysis (TEN), คาร์บามาซีพีน

บทนำ

กลุ่มอาการ Steven-Johnson Syndrome (SJS) และกลุ่มอาการ toxic epidermal necrolysis (TEN) คืออาการแพ้ยาหรืออาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่รุนแรงและทำให้ผู้ที่แพยามีโอกาสพิการหรือเสียชีวิตมากถึงร้อยละ 30 งานวิจัยในประชากรของประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยที่มี HLA-B* 15:02 มีความเสี่ยงต่อการเกิด SJS/TEN จากยา carbamazepine เพิ่มขึ้น 54.76 เท่า¹ สาเหตุที่สำคัญของการเกิด SJS/TEN คือ เกิดจากปฏิกิริยาไวเกินของร่างกายที่ตอบสนองต่อยา ไม่สามารถคาดการณ์ได้และไม่ขึ้นกับขนาดยาที่ใช้ ผู้ที่มีอาการแพ้ยาดังกล่าวจะมีผื่นขึ้นที่ผิวหนังและเยื่อเมือกทั่วร่างกายมีการอักเสบที่รุนแรงทำให้ผิวหนังตายและ

หลุดลอก อาจมีภาวะติดเชื้อแทรกซ้อนที่อวัยวะสำคัญ ได้แก่ ปอด ตับ และไต มีความรุนแรงที่ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างถาวร เช่น ตาบอด หรือเสียชีวิตได้ อัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 1-5 ใน SJS และร้อยละ 25-35 ใน TEN และจะสูงขึ้นในผู้สูงอายุหรือในผู้ป่วยที่สูญเสียผิวหนังเป็นพื้นที่กว้าง² ส่วนใหญ่จะได้รับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลเป็นระยะเวลานาน ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงและต้องรักษาต่อเนื่องหลังจากออกจากโรงพยาบาลเป็นเวลาหลายเดือน ส่งผลให้มีภาระด้านรายจ่ายจากการรักษาโรคที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการรักษาผื่นแพ้ยาชนิดกลุ่มอาการ SJS/TEN มีค่าใช้จ่ายประมาณ 20,000-100,000 บาทต่อคน และสูงถึง 330,000 บาทในรายที่มีระยะเวลาการรักษาในโรงพยาบาลนานกว่าปกติ³

ยา carbamazepine เป็นสาเหตุของการแพ้ยาทำให้เกิดกลุ่มอาการ SJS/TEN มากในประเทศไทยและมาเลเซีย¹ ถูกบรรจุในบัญชี ก ของบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2551 และเป็นยามาตรฐานสำหรับสถานพยาบาลทุกระดับ เพราะมีหลักฐานทางวิชาการชัดเจนที่สนับสนุนการใช้ยาและมีประสิทธิภาพการใช้ในประเทศไทยอย่างพอเพียงสำหรับใช้ในการรักษาโรคลมชัก การบรรเทาอาการปวดที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neuropathic pain) เนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพและราคาไม่แพง จึงถูกจัดให้เป็นยาที่ควรเลือกใช้เป็นอันดับแรก (first-line drug) ในการรักษาโรคลมชักและภาวะ neuropathic pain^{9, 10} พบอุบัติการณ์การเกิดผื่นแพ้ยาชนิดกลุ่มอาการ SJS/TEN จากยา carbamazepine ทั้งในและต่างประเทศได้แก่ ไต้หวันและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบอุบัติการณ์สูงกว่าประเทศทางทวีปยุโรปและอเมริกา⁴

ในปัจจุบันมีการวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของมนุษย์ที่มีผลต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาและพบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีนในกลุ่ม HLA-B* 15:02 กับ การเกิดผื่นแพ้ยาชนิด SJS/TEN จากยา carbamazepine⁵⁻¹⁰ ยีน HLA-B* 15:02 พบได้มากในคนเอเชียและมีความจำเพาะกับเอเชียใต้ประมาณ 2-15% แต่พบไม่เกิน 0.1% ในคนเกาหลี ญี่ปุ่นและไม่พบในคนผิวขาว¹⁵ การตรวจหา ยีน HLA-B* 15:02 ก่อนจ่ายยาจะสามารถช่วยแพทย์ในการเลือกใช้ยาในการรักษาเพื่อป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์หรือแพ้ยาในผู้ป่วยได้

การตรวจวิเคราะห์เพื่อหา ยีน HLA-B* 15:02 มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น sequencing specific primer polymerase chain reaction (SSP-PCR)¹¹ เป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบันแต่ต้องใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีราคาแพงในการตรวจวิเคราะห์หรือการใช้เทคนิค standard salting out method ในการสกัดดีเอ็นเอที่ถึงแม้จะมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าแต่ต้องใช้ระยะเวลานานในการตรวจวิเคราะห์และรายงานผล¹² นอกจากสองวิธีข้างต้นแล้วยังมีวิธี

conventional polymerase chain reaction (cPCR) ซึ่งยังมีข้อจำกัดเรื่องกระบวนการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel ทราบผลช้าและอาจเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่เพิ่มไปแล้ว ส่วนวิธี polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotides probe (PCR-SSOP)¹³ ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงซึ่งเหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณสูง ทำให้ปัจจุบันมีการนำเทคนิค real time PCR (RT-PCR) มาใช้เพื่อลดขั้นตอนการตรวจสอบ สามารถตรวจวัดผลผลิตของ PCR แต่ละรอบโดยใช้การติดตามด้วยสารเรืองแสงไปพร้อมกับการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้พร้อมกัน¹⁴ สามารถลดการปนเปื้อนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการผิดพลาดของการทดสอบ แต่การนำเทคนิค RT-PCR มาใช้ในการตรวจ HLA-B* 15:02 ยังไม่เป็นที่แพร่หลายเนื่องจากต้องใช้ชุดการทดสอบสำเร็จรูปที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงซึ่งการศึกษาวิจัยในการตรวจหาฮีน HLA-B*15:02 ด้วยเทคนิค real-time PCR ในประเทศไทย ดังการศึกษาของจิราภรณ์และคณะ (2021) ได้ทำการตรวจ HLA-B locus โดยการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 22 คู่ และทำการทดสอบในตัวอย่าง DNA ที่ทราบชนิดของ HLA แล้ว ดังนั้นการศึกษานี้ต้องการพัฒนาวิธีการตรวจฮีน HLA-B*15:02 โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อฮีน HLA-B*15:02 เท่านั้น นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน (gold standard) ด้วยวิธีการหาลำดับสารทางพันธุกรรม (DNA sequencing) ยังมีข้อจำกัดหลายประการเช่นต้องใช้เครื่องมือพิเศษราคาแพง ขั้นตอนยุ่งยากและต้องใช้เวลาในการตรวจนานหลายวัน การศึกษานี้จึงได้นำองค์ความรู้ใหม่ ๆ โดยการออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อฮีน HLA-B* 15:02 เทียบกับการทดสอบที่เป็นวิธีมาตรฐาน DNA sequencing มาพัฒนาเทคนิคการตรวจ real-time PCR เพื่อตรวจหาฮีน HLA-B* 15:02 ที่มีประสิทธิภาพราคาไม่แพง ลดระยะเวลาการรอคอยผลที่ส่งไปตรวจนอกสถาบันประสาทวิทยา เพื่อช่วยให้แพทย์ใช้เป็นข้อมูลในวางแผนการรักษาผู้ป่วยด้วยยา carbamazepine ต่อไป

วัตถุและวิธีการ (Materials and Method)

การเก็บตัวอย่างผู้เข้าร่วมวิจัย

โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่งานห้องเจาะเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ใส่หลอดสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 1 หลอด ผสมเลือดให้เข้ากันกับ EDTA จนแน่ใจว่าเลือดไม่แข็งตัวเป็นลิ่ม นำส่งเลือดไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 24 ชั่วโมง ถ้าส่งไม่ทันภายในวันเดียวกันให้แช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C (ห้ามแช่แข็ง) แล้วส่งวันรุ่งขึ้น

การแยกสกัดสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างเลือดมาสกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit และใช้เครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ SLA-E13200 (TANBead®) และทำการวัดความเข้มข้นของสาร พันธุกรรมในแต่ละตัวอย่างด้วยน้ำยา Qubit® dsDNA BR Assay Kits (Invitrogen™, USA) และ Qubit® dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen™, USA) โดยใช้เครื่อง Qubit™ 3 Fluorometer (Invitrogen™, USA) ไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการศึกษา

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับฮีน HLA-B* 15:02 โดยอาศัยพื้นฐานจากงานวิจัยของ Dinh Van และคณะ¹⁴ ทำการออกแบบไพรเมอร์และ probe ของฮีน HLA-B*15:02 โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI Database เลข Accession Number : HM595430.1 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปออกแบบด้วยโปรแกรม IDT's PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Inc) เมื่อได้ไพรเมอร์และ Probe คู่ที่ต้องการแล้วนำไปทดสอบ self-complementary และ hair pin loop ด้วยโปรแกรม Oligocal นำไพรเมอร์ไป blast กับ ฐานข้อมูลของ NCBI เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ในส่วนของ internal control ใช้ฮีน 18SrRNA ในการรันทดสอบควบคู่ไปด้วยทุกตัวอย่าง¹⁵ ทำการทดสอบหา condition ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR สำหรับไพรเมอร์และ probe ที่ออกแบบขึ้นมา นี้โดยทดสอบด้วยวิธี gradient PCR ก่อน เมื่อได้ condition ที่เหมาะสมของปฏิกิริยาแล้ว จึงเริ่มทำการทดสอบกับตัวอย่างจริง

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะและโพรบสำหรับตรวจวิเคราะห์ยีน HLA-B*15:02

Amplicon เป้าหมาย	ชื่อ oligos	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'--> 3')	แอมพลิคอน (bp)	ความยาว ไพรเมอร์ (bp)	อุณหภูมิ หลอมเหลว (°C)
HLA-B* 15:02	B-15:02_F-primer Forward	AAG TGT TCC CTG CCT CAT TAC	125	21	54.9
	B-15:02_FAM-Probe	FAM-CCC TGT GTG -Zen-CCA GCA CTT ACT CTT-3IABkFQ		24	61.1
	B-15:02_R-primer Reverse	GGC GAT ACA TCT GTC CTT CAT T		22	54.8
HLA-B* 15:02 modify	B-15:02_F-primer modify	CGC GAG TCC GAG GAT GGC	121	18	61.2
	B-15:02_CY5 Probe	Cy5-CGG AAC ACA TAO CAG ATC TCC AAG ACC AA-3IAbRQsP		26	60.5
	B-15:02_R-primer modify	GGT TCC GCA GGC TCT CT		17	57.4
18S rRNA	18SDIR Forward	TGG TGC CAG CAG CCG C	77	16	62.8
	18SP Probe	HEX-CGC TAT TGG-Zen-AGC TGG AAT TAC C-BkFQ		26	55.7
	18SINV Reverse	TCC AAC TAC GAG CTT TTT AAC TGC A		25	56.8

T = thymine , C = cytosine , A = adenine , G = guanine

การทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น

ทำการทดสอบหา ยีน HLA-B* 15:02 จาก purified genomic DNA ที่ทราบชนิดของยีน HLA-B* 15:02 จากตัวอย่างที่ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ออกแบบขึ้นมาใหม่ด้วยเทคนิค real-time PCR

การตรวจวิเคราะห์ยีน HLA-B*1502 ในตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

นำตัวอย่างที่ทำการสกัด DNA ไว้มาทำการทดสอบหา ยีน HLA-B* 15:02 โดยใช้ primer ชุดที่ออกแบบขึ้นมาด้วยเทคนิค real-time PCR รายงานผลการตรวจโดยเทียบกับ positive และ negative control จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดส่งตรวจยืนยันยีน HLA-B* 15:02 ด้วยวิธี DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและประเมินผล

เตรียมตัวอย่างทดสอบก่อนส่งยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน (DNA sequencing)

หลังจากทำการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR ที่ออกแบบขึ้น ต้องมีการนำตัวอย่างและผลไปเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (DNA sequencing) ก่อนทำการส่งตัวอย่างไปยืนยันด้วยวิธี sequencing จะต้องมีการตรวจสอบตัวอย่าง DNA ก่อน โดยทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี conventional PCR เพื่อให้ได้ตัวอย่าง DNA ที่จะนำไป sequencing ต่อ หลังจากเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วทำการตรวจสอบ DNA ที่ได้ว่ามีปริมาณสารพันธุกรรมถูกต้องตามยีนเป้าหมายที่ต้องการและมี DNA หรือ PCR product เพียงพอที่จะส่งต่อไป sequencing หรือไม่ ด้วยการทำ gel electrophoresis โดยเตรียม 1.5% agarose gel รันด้วยวิธีการแยกขนาด PCR Band โดยใช้ไฟฟ้า กับ Tri-Borate EDTA buffer (TBE buffer) จากนั้นทำการ purify PCR product ที่ได้ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ DNA ที่ต้องการ และเพื่อให้ได้ DNA ที่เหมาะสมที่จะนำไปทำการตรวจยืนยัน ขั้นตอนสุดท้ายคือนำส่งตัวอย่างไปตรวจยืนยันด้วยวิธี Sanger gene sequencing

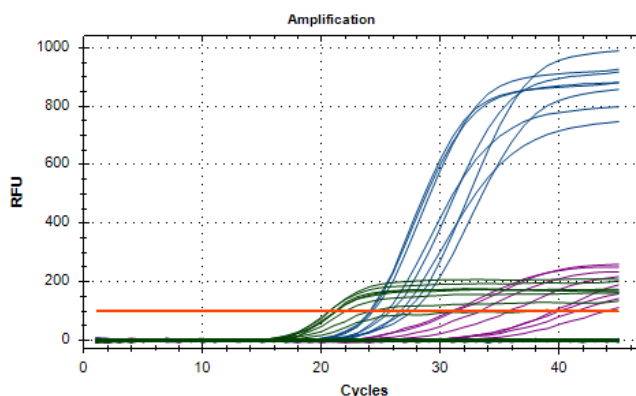
การวิเคราะห์ทางสถิติ

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ในการศึกษานี้ด้วยการหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ของการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (sanger gene sequencing)

เมื่อได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัย โดยผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ สถาบันประสาทวิทยา โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อเข้าร่วมโครงการ โดยเป็นบุคคลที่มีเชื้อชาติและสัญชาติไทย อายุตั้งแต่ 18 ถึง 60 ปี โดยมีการคำนวณหากลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษาวิจัยจากสัดส่วนของยีน HLA-B*15:02 ที่พบได้ในประชากรชาวไทย ได้จำนวน 76 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่าง เลือดผู้ป่วยที่งานห้องเจาะเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ใส่หลอดสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 1 หลอด โดยเป็นการเจาะเลือดเพิ่มเมื่อผู้ป่วยมีนัดเจาะเลือดกับแพทย์ผู้รักษาที่สถาบันประสาทวิทยาตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2565-31 มิถุนายน 2566 หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดมาสกัดสารพันธุกรรม โดยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ และทำการวัดความเข้มข้นของสารพันธุกรรมในแต่ละตัวอย่าง นำสารพันธุกรรมที่ได้นั้นไปตรวจวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์และโพรบที่ได้ออกแบบขึ้น ทำการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR หลังจากนั้นตัวอย่างที่ทำการสกัด DNA ไว้มาทำการทดสอบหา ยีน HLA-B* 15:02 โดยใช้ primer ชุดที่ออกแบบขึ้นมาด้วยเทคนิค real-time PCR รายงานผลการตรวจ โดยเทียบกับ positive และ negative control จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดส่งตรวจยืนยันยีน HLA-B* 15:02 ด้วยวิธี DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและประเมินผล หลังจากนั้นนำตัวอย่างและผลไปเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (DNA sequencing) ก่อนทำการส่งตัวอย่างไปยืนยันด้วยวิธี sequencing สถิติที่ใช้วิเคราะห์ในการศึกษาวิจัย คือการหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ของการทดสอบ เทียบกับวิธีมาตรฐาน gene sequencing

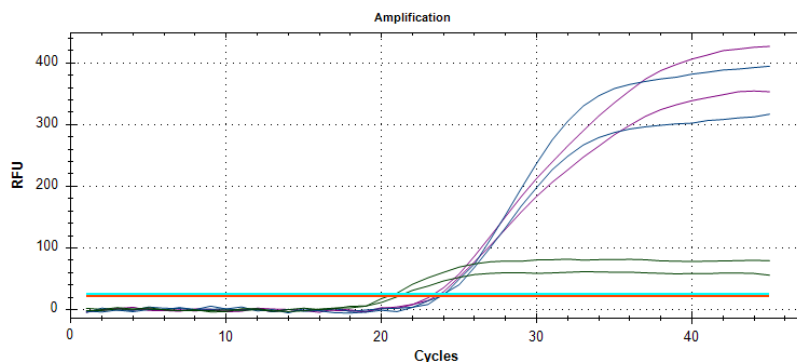
ผล (Result)

Optimized of multiplex real-time PCR เพื่อระบุหา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณ ยีน HLA-B*15:02 ที่จะช่วยให้ primer และ probe ที่ออกแบบจับกับยีนเป้าหมายที่ต้องการได้อย่างจำเพาะ โดยทำ multiplex gradient PCR ซึ่งเป็นการตั้งค่าอุณหภูมิในแต่ละหลุม A-H เริ่มตั้งแต่ 55 องศาเซลเซียส จนถึง 65 องศาเซลเซียส หลังจากทดสอบพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับ primer สำหรับปฏิกิริยาในการทำ multiplex real-time PCR เพื่อใช้ตรวจหา HLA-B*15:02 gene คือ 63 องศาเซลเซียส และจำนวนรอบของการทำ multiplex real-time PCR ที่ใช้คือ จำนวน 45 รอบ ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมทั้งสิ้น 73 นาที



รูปที่ 1 กราฟแสดง gradient PCR ในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อไพรเมอร์และโพรบในการทำ Real-time PCR

หลังจากได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing แล้ว ทำการหาสถานะที่เหมาะสมของอัตราส่วนของ primer ต่อ probe อัตราส่วนที่ดีที่สุดของความเข้มข้นระหว่าง primer และ probe ของ B-15:02 ที่ได้คือ 1 : 1 อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ primer ต่อ probe ของ B-15:02 modify คือ 1:1 และ อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ primer ต่อ probe ของ 18s rRNA (internal control) อยู่ที่ 1 : 1



รูปที่ 2 กราฟแสดงสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา HLA-B*15:02

นำตัวอย่างที่ได้ผล HLA-B*15:02 positive ไปทดสอบต่อโดยการทำ conventional PCR ซึ่งใช้ primer B-15:02 modify ในการทำเพื่อส่งทดสอบ DNA sequencing ต่อ เพื่อเทียบผลระหว่าง multiplex real-time PCR method กับ sequencing method หลังจากทำ conventional PCR เสร็จ ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้ด้วยการนำไปรัน gel electrophoresis พบ PCR band ประมาณ 125 bp จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำการ purify และนำส่งไป sequencing ต่อไป

Result of validation

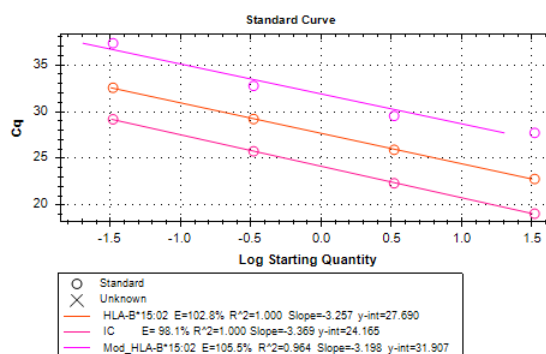
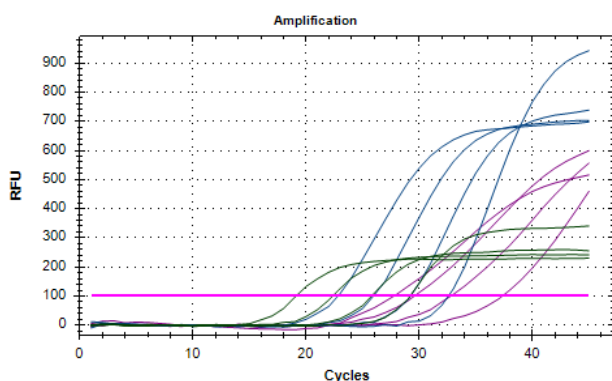
เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีการทดสอบที่พัฒนาขึ้น ได้ทำการทดสอบ multiplex real-time PCR กับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 76 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 29 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ HLA-B* 15:02 และ 47 ตัวอย่างที่ให้ผลลบกับ HLA-B* 15:02 ที่ค่า Ct [mean standard error of mean (SEM)] 30.03 ± 3.55 (Cy5) 26.68 ± 2.82 (FAM) 23.56 ± 3.72 (HEX) คิดเป็นร้อยละ 38 และ 62 ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทำ multiplex real-time PCR assay ได้นำไปเปรียบเทียบกับ Sanger gene sequencing ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธี Sanger gene sequencing และวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น มีค่าความไวร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนาย

ผลบวกร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 100 ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกลวง หรือผลลบลวง

ตารางที่ 2 แสดงการคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ของการตรวจวิเคราะห์หา HLA-B*15:02 ด้วยเทคนิค real-time PCR

วิธีทดสอบ		การหาลำดับเบสด้วยวิธี Sanger gene sequencing	
		Present	Absent
วิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้น	ผลบวก	29	0
	ผลลบ	0	47

Limit of detection of multiplex real-time PCR method นำ DNA ที่ทราบความเข้มข้น (30 ng/ μ L) ทำการ dilute 10 fold dilution ออกเป็น 4 ความเข้มข้นได้ความเข้มข้นที่ 33, 3, 0.3 และ 0.03 ng/ μ L ผลการทดสอบหา limit of detection ของการตรวจคัดกรอง HLA-B* 15:02 ด้วยวิธี multiple real-time PCR โดยใช้ primer และ probe คู่ที่ออกแบบเอง อยู่ที่ 0.03 ng/ μ L



รูปที่ 3 รูปแสดง standard curves ของวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้น

Method comparison เปรียบเทียบผล multiplex real-time PCR และผล Sanger gene sequencing ใน 29 ตัวอย่างที่ positive ต่อยีน HLA-B* 15:02 ในฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่ามีค่า percent identity เท่ากับ 100% และทำการ alignment พบว่า ตัวอย่าง PCR product ทั้งหมด 76 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นส่งไปตรวจหาลำดับเบสของ DNA โดยวิธี Sanger gene sequencing ให้ผล alignment ตรงกับ reference gene พบว่าตัวอย่าง PCR product ทั้ง 29 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกับ HLA-B*15:02 และ 47 ตัวอย่างที่ให้ผล negative ไม่มีความสัมพันธ์กับยีน HLA-B*15:02

วิจารณ์ (Discussion)

การตรวจคัดกรองอัลลีล HLA-B*15:02 มีประโยชน์ต่อการตัดสินใจรักษาด้วยยา carbamazepine ทั้งในทางคลินิกและทางเศรษฐศาสตร์ อย่างไรก็ตาม การตรวจคัดกรองนั้นจำเป็นต้องมีการพิจารณาความเหมาะสม รวมถึงทราบข้อจำกัดของวิธีการตรวจคัดกรองอัลลีล HLA-B*15:02 การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อคัดกรองอัลลีล HLA-B*15:02 ในทางปฏิบัติจะใช้ตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA นำไปสกัด DNA และตรวจว่ามี HLA-B*15:02 หรือไม่ (allele specific screening) ด้วยวิธี PCR หรือ real-time PCR หรือ hybridization ส่วนการตรวจ HLA-typing จะช่วยระบุชนิดของอัลลีล HLA โดยใช้หลักการการหาลำดับเบส (sequencing) หรือการ hybridize กับโพรบจำนวนมาก วิธีการตรวจที่แตกต่างกันนี้ขึ้นกับศักยภาพและความพร้อมของห้องปฏิบัติการ การวิจัยและพัฒนานี้แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพและราคาไม่แพงสำหรับการตรวจทางอณูชีวโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้หลักการวิธีการตรวจแบบ multiplex real-time PCR ซึ่งมี TaqMan® probe เป็นสารเรืองแสงที่ใช้จับกับยีนเป้าหมาย มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้สำหรับตรวจคัดกรองหายีน HLA-B*15:02 ในผู้ป่วยที่มารับบริการที่สถาบันประสาทวิทยา ก่อนได้รับการรักษาเพื่อป้องกันการเกิดผื่นแพ้ยา กลุ่มอาการ SJS/TEN ที่เกิดจากการใช้ยารักษาโรคลมชัก โรค neuropathic pain คือ ยา carbamazepine ซึ่งส่วนใหญ่จะพบยีนนี้ในกลุ่มประชากรเชื้อสายเอเชีย เมื่อเปรียบเทียบกับ Luminex SSO/SBT/SSP ซึ่งปัจจุบันใช้สำหรับการตรวจ HLA typing วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัย TaqMan® probe เพื่อตรวจคัดกรองหายีน HLA-B*15:02 ในประชากรชาวไทย การตรวจ HLA-B*15:02 เพียงอัลลีลเดียว แม้จะช่วยคัดกรองผู้ที่อาจมีการแพ้ยาที่รุนแรงได้เป็นส่วนใหญ่ แต่อาจยังไม่สมบูรณ์ในการศึกษาที่ไม่พบ HLA-B allele อื่นที่เป็นสมาชิก

ของ B75 serotype (HLA-B*15:08, HLA-B*15:11, HLA-B*15:21 และ HLA-B*15:31) ซึ่งมีความถี่น้อยในประชากรชาวไทย แต่ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการแพ้ยารุนแรงได้เช่นเดียวกัน⁷⁻⁸ ซึ่งถ้าเป็นกรณีของการตรวจวิเคราะห์ที่คัดกรองเฉพาะอัลลีล HLA-B*15:02 อาจทำให้มีโอกาสไม่พบอัลลีลอื่น ๆ ที่เป็นสมาชิกของ B75 serotype หรือ HLA-A*31:01 ซึ่งพบบ่อยใน กลุ่มประชากรยุโรป³ โดยเฉพาะในสถานพยาบาลที่มีการให้บริการผู้ป่วยต่างชาติ โดยทั่วไประยะเวลาในการรอผลตรวจ (turnaround time) คือประมาณ 7 วัน แต่บางกรณีอาจใช้เวลาน้อยกว่าได้ เช่น ห้องปฏิบัติการของสถานพยาบาลมีความสามารถตรวจลักษณะทางพันธุกรรมได้เอง ซึ่งระยะเวลาการผลนี้เป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อแนวทางในการดูแลและจัดการความเสี่ยงจากการแพ้ยาของผู้ป่วยด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรมีการวางแผนหรือปรับปรุงแนวทางการจัดการผู้ป่วยด้วยเสมอเมื่อมีการส่งตรวจลักษณะทางพันธุกรรม เนื่องจากข้อมูลการศึกษาในปัจจุบันพบว่า การตรวจ HLA-B*15:02 มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 100 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 98.7¹⁷ และยังมีโอกาสที่จะเกิดทั้งผลบวกปลอม (false positive result) และ ผลลบปลอม (false negative result) ได้อยู่

จากการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์หายีนแพ้ยา HLA-B*15:02 ด้วยวิธี multiplex real-time PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่ใช้ในการวิจัยและพัฒนาขึ้น พบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบยีน HLA-B*15:02 จากตัวอย่างของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยได้โดยตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมด 76 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มารับการบริการที่สถาบันประสาทวิทยาพบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ตรวจพบตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผล HLA-B*15:02 positive จำนวน 29 ตัวอย่าง และส่งตัวอย่างทั้งหมดไปทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Sanger gene sequencing และได้ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ที่ส่งไปตรวจยังห้องปฏิบัติการภายนอกที่โรงพยาบาลรามาธิบดีพบว่ามีความสอดคล้องและตรงกันของผลการตรวจวิเคราะห์ให้ผลความไวในการตรวจวิเคราะห์เท่ากับ 100% และการตรวจวิเคราะห์นี้ไม่เกิด false positive และ false negative ที่เกิดจากความผิดพลาดในการตรวจวิเคราะห์ในวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยมีค่าทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) อยู่ที่ 100.0% ในขั้นตอนการแปลผลนั้น จะแปลผลเป็นบวกเมื่อผล real-time PCR แสดงให้เห็นถึงกราฟทั้ง 2 เส้นของไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน HLA-B*15:02 วิธีการตรวจวิเคราะห์หายีน HLA-B*15:02 ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR มีข้อได้เปรียบทางเทคนิคเมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่มีจำหน่ายทั่วไป (commercial

kits: PG1502 Detection kit, Pharmigene® Inc, Taiwan) และ วิธีการอื่น ๆ (nested PCR, AS-PCR with DDB) multiplex real-time PCR ยังถือว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดอุบัติการณ์ของผลลบที่เกิดจากดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำ หรือการมีอยู่ของสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR (PCR inhibitors) นอกจากนี้ยังมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพในการตรวจจับยีนเป้าหมายมากกว่าการทดสอบ gel electrophoresis ใน agarose gel โดยการใช้ไพรเมอร์สองคู่ ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพและมีความไวสูงในการตรวจจับยีนเป้าหมายในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 0.03 ng/μl โดยมีการใช้ DNA ปริมาณเพียง 2 μl สำหรับแต่ละปฏิกิริยา PCR สำหรับการเปรียบเทียบในแง่ของเวลาและค่าใช้จ่าย วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมที่ประยุกต์ใช้ในทางคลินิก การคำนวณต้นทุนต่อหน่วยของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น รวมถึงน้ำยาในการสกัดดีเอ็นเอ, น้ำยา master mix, oligo primer และโพรบที่ติดฉลากด้วยสีย้อมเรืองแสง มีราคาเพียง 467 บาทต่อตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีราคาถูกกว่า nested PCR, PCR-SSO, PCR-SSOP อย่างไรก็ตามการที่ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งมีความไวสูงมากในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม และการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมซ้ำของวิธี nested PCR ทำให้เกิดความเสี่ยงที่จะทำให้เกิด cross contamination ของตัวอย่างสารพันธุกรรม ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดผล false positive ขึ้น เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในขั้นตอนทั้งหมดของการตรวจวิเคราะห์ วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาทั้งหมด 113 นาที ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นานกว่าวิธี LAMP แต่ก็ยังเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากสามารถทราบผลการตรวจวิเคราะห์ได้ภายในหนึ่งวันหลังจากรับตัวอย่าง ซึ่งก่อนหน้านี้ทางห้องปฏิบัติการได้มีการส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการภายนอกสถาบันมีระยะเวลาการรอคอยผลการตรวจ 3-7 วัน

ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถลดระยะเวลาการรอคอยผลการตรวจวิเคราะห์ของผู้ป่วยได้อีกด้วย มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ผลตรวจหา ยีน HLA-B*15:02 เป็น negative สามารถใช้ยา carbamazepine ได้เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามเคยมีรายงานว่าร้อยละ 11 (5/42) ของคนไทยที่เป็น SJS/TEN จากยา carbamazepine ที่มีผล HLA-B*15:02 negative¹ ส่วนผู้ป่วยที่มีผลตรวจหา ยีน HLA-B*15:02 positive ให้หลีกเลี่ยงการใช้ยา carbamazepine ถึงแม้จะมีรายงานว่าคนไทยร้อยละ 17.5 (4/40) ไม่เป็น SJS/TEN จากการใช้ยา carbamazepine ทั้งที่มีผลตรวจ HLA-B*15:02 positive¹⁸ อีกทั้งเนื่องจากเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใช้เอง (in-house method) ดังนั้นจึงควรมีการนำวิธีตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปทำการทดสอบเพิ่มเติมอีกครั้งในประชากรกลุ่มอื่น ๆ ก่อนที่จะนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์หา ยีนแพ้ยา HLA-B*15:02 ในผู้ป่วยที่มาใช้บริการที่สถาบันประสาทวิทยาต่อไป

สรุป (Conclusions)

แนวทางการตรวจคัดกรองยีนแพ้ยาที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาทางผิวหนังอย่างรุนแรงด้วยการตรวจหา ยีน HLA-B*15:02 ในผู้ป่วยใหม่ทุกรายก่อนได้รับการรักษาด้วยยา carbamazepine ช่วยทำให้ลดความเสี่ยงของการเกิดผื่นแพ้ยาชนิดรุนแรงชนิด SJS/TEN ในผู้ป่วยได้ การวิจัยและพัฒนาที่ได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาการตรวจตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะเพื่อคัดกรองยีน HLA-B*15:02 ในผู้ป่วยที่มาใช้บริการที่สถาบันประสาทวิทยา ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ลดค่าใช้จ่ายในการส่งต่อสิ่งส่งตรวจไปตรวจวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการภายนอก ช่วยลดระยะเวลาการรอคอยผลการตรวจ สามารถช่วยให้แพทย์ใช้ยารักษาผู้ป่วยได้อย่างสมเหตุสมผล อีกทั้งยังช่วยสนับสนุนศูนย์ความเป็นเลิศโรคลมชักของสถาบันประสาทวิทยา

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararungton T, Chen P, Lin SY, Chen WH, et al. Association between HLA-B*1502 and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population. *Epilepsia* 2010;51(5):926-30.
2. Harr T, French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:39.
3. Locharernkul C, Shotelersuk V, Hirankarn N. Pharmacogenetic screening of carbamazepine-induced severe cutaneous allergic reactions. *J Clin Neurosci* 2011;18(10):1289-94.
4. Yang CY, Dao RL, Lee TJ, Lu CW, Yang CH, Hung SI, et al. Severe cutaneous adverse reactions to antiepileptic drugs in Asians. *Neurology* 2011;77(23):2025-33.

เอกสารอ้างอิง (References)

5. Locharernkul C, Loplumlert J, Limotai C, Korkij W, Desudchit T, Tongkobpetch S, et al. Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with HLA-B*1502 allele in Thai population. *Epilepsia* 2008;49(12):2087-91.
6. 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(12):1126-33.
7. Lim KS, Kwan P, Tan CT. Association of HLA-B*1502 allele and carbamazepine induced severe adverse cutaneous drug reaction among Asians, a review. *Neurology Asia* 2008;13:15-21.
8. Man CB, Kwan P, Baum L, Yu E, Lau KM, Cheng AS, et al. Association between HLAB*1502 allele and antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Han Chinese. *Epilepsia* 2007;48(5):1015-8.
9. Pavlos R, Mallal S, Phillips E. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics* 2012;13(11):1285-306.
10. Wang Q, Zhou JQ, Zhou LM, Chen ZY, Fang ZY, Chen SD, et al. Association between HLA-B*1502 allele and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions in Han people of southern China mainland. *Seizure* 2011;20(6):446-8.
11. Virakul S, Kupatawintu P, Nakkuntod J, Kangwanshiratada O, Vilaivan T, Hirankarn N. A nested sequence-specific primer-polymerase chain reaction for the detection of HLA-B*15:02. *Tissue Antigens* 2012;79(4):295-301.
12. Sayer DC, Cossell HS, Christiansen FT. HLA-B*27 typing by sequence specific amplification without DNA extraction. *Mol Pathol* 1999;52(5):300-1.
13. Puangpetch A, Koomdee N, Chamnanphol M, Jantararoungtong T, Santon S, Prommas S, et al. HLA-B allele and haplotype diversity among Thai patients identified by PCR-SSOP: evidence for high risk of drug-induced hypersensitivity. *Front Genet* 2015;5(478):1-7.
14. 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(12):1140-6.
15. Pegels N, Gonzalez I, Lopez-Calleja I, Fernandez S, Garcia T, Martin R. Evaluation of a TaqMan real-time PCR assay for detection of chicken, turkey, duck, and goose material in highly processed industrial feed samples. *Poult Sci* 2012;91(7):1709-19.
16. Prasertsang J, Vejbaesya S, Luangtrakool K, Chongkolwatana V. Development of in-house real-time polymerase chain reaction for HLA-B locus typing. *J Hematol Transfus Med* 2021;31:253-9.
17. Buchner A, Hu X, Aitchison KJ. Validation of single nucleotide variant assays for human leukocyte antigen haplotypes HLA-B*15:02 and HLA-A*31:01 across diverse ancestral backgrounds. *Front Pharmacol* 2021;12:713178.
18. Kulkantrakorn K, Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararoungtong T, Prabmechai N, Vannaprasaht S, et al. HLA-B*1502 strongly predicts carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Thai patients with neuropathic pain. *Pain Pract* 2012;12(3):202-8.