DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUES FOR HUMAN PLATELET ANTIGEN (HPA) GENOTYPING

MAYUREE KENGKATE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUES FOR HUMAN PLATELET ANTIGEN (HPA) GENOTYPING

MAYUREE KENGKATE 5237515 RACP/D

Ph.D. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PUNNEE BUTTHEP, Ph.D., WASUN CHANTRATITA, Ph.D., OYTIP NATHALANG, Ph.D.

ABSTRACT

Human platelet antigens (HPA) genotyping, together with HPA alloantibody detection are the gold standard for the diagnosis of immune thrombocytopenic patients due to HPA antibodies. The objective of this study is to develop and establish the in-house multiplex PCR for routine services and to compare the results to Simple-Probe real-time PCR technique. Multiplex PCR for HPA-1 to -7 and -15 was established and five hundred DNA samples were tested. Simple-Probe real-time PCR technique was used in 500 DNA samples for HPA-1 to -7 and -15 genotyping and 300 DNA samples were tested for HPA-8 to -17 genotyping. The comparison results of HPA-1 to -7 and -15 genotyping between two techniques showed 100% concordance in HPA-1 to -4 and -7. The misinterpretation of HPA-5, -6 and -15 was found in eight samples using Simple-Probe real-time PCR. The DNA sequencing was used to confirm and found that the misinterpretations of HPA-5, -6 and -15 caused by an NM_002203.3:c.1594A>C mutation (rs199808499) near the HPA-5 SNP, an NM_000212.2:c.1545G>A mutation near the HPA-6 SNP and an NM_133493.1:c. 2118C>A mutation near HPA-15 SNP. All genotypes of HPA-8 to -17 (Excepts HPA-12 and -16) were homozygous a/a. HPA-12 and HPA-16 genotyping could not be established because they were high G-C contents around HPA SNP. The sensitivity and specificity of multiplex PCR were 100%, whereas, the sensitivity and specificity of Simple-Probe real-time PCR were 99.9% and 99.79%, respectively.

The advantages of in-house multiplex PCR include being less expensive, simple, accurate and suitable for HPA genotyping for routine laboratories in developing countries, but it is not suitable for mass donor screening. The Simple-Probe real-time PCR is suitable for mass donor screening, but it needs for more complex equipment, more expensive reagents and better trained personnel. Therefore, two genotyping techniques using different primer sets could be employed for routine laboratories to avoid misinterpretation.

KEY WORDS: HPA/ MULTIPLEX PCR/ SIMPLE-PROBE REAL-TIME PCR/ GENOTYPING/ THAIS

161 pages

Copyright by Mahidol University

การพัฒนาวิธีการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดแอนติเจนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TECHNIQUES FOR HUMAN PLATELET ANTIGEN (HPA) GENOTYPING

มยุรี เก่งเกตุ 5237515 RACP/D

ปร.ด. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: พรรณี บุตรเทพ, ปร.ด., วสันต์ จันทราทิตย์, ปร.ด., อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, ปร.ด.

บทคัดย่อ

การตรวจหายีนของเกล็ดเลือดแอนติเจนร่วมกับการตรวจหาแอนติบอดีของเกล็ดเลือด เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ จากการมีแอนติบอดีของเกล็ดเลือด วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาชุดตรวจหายีนของเกล็ดเลือดด้วยเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้ในงานบริการ และเพื่อเปรียบเทียบผลตรวจกับเทคนิค Simple-Probe real-time PCR

จากการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาและผลิตชุดตรวจ in-house multiplex PCR สำหรับตรวจยีนของเกล็ดเลือดแอนติเจนระบบ HPA-1 ถึง HPA-7 และ HPA-15 ทำการตรวจตัวอย่างดีเอนเอจำนวน 500 ตัวอย่าง นำไปเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค Simple-Probe real-time PCR และได้ตรวจหายีนของเกล็ดเลือดระบบ HPA-8 ถึง HPA-17 ด้วยเทคนิค Simple-Probe real-time PCR จำนวน 300 ตัวอย่าง การเปรียบเทียบผลการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดแอนติเจนระบบ HPA-1 ถึง HPA-7 และ HPA-15 ของทั้งสองเทคนิคพบว่า ผลตรวจหายีนระบบ HPA-1 ถึง HPA-4 และ HPA-7 ให้ผลสอดคล้องกัน 100% แต่มีการแปลผลผิดพลาด 8 ตัวอย่าง ของการตรวจหายีนของ HPA-5 HPA-6 และ HPA-15 เมื่อใช้เทคนิค Simple-Probe real-time PCR และจากการตรวจยืนยันด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่าเกิดจาก polymorphism อื่นๆที่อยู่ใกล้กับ single nucleotide polymorphism (SNP) ของ HPA ระบบต่างๆ คือ พบว่า NM_002203.3:c.1594A>C mutation (rs199808499) ที่อยู่ใกล้กับ HPA-5 SNP, NM_000212.2:c.1545G>A mutation ใกล้กับ HPA-6 SNP และ NM_133493.1:c. 2118C>A mutation ใกล้กับ HPA-15 SNP ส่วนการตรวจหายีนของ HPA-8 ถึง HPA-17 พบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้ผลการตรวจเป็นแบบ homozygous a/a ยกเว้น HPA-12 และ HPA-16 ไม่สามารถผลิตชุดตรวจได้เนื่องจากบริเวณใกล้เคียง HPA-12 และ HPA-16 SNP มี GC ประกอบในสายดีเอนเอมาก ความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ multiplex PCR คือ 100% ส่วน Simple-Probe มีความไว 99.9% และความจำเพาะ 99.79% ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษาครั้งนี้ วิธี in-house multiplex PCR มีข้อดีคือราคาประหยัด ง่าย มีความถูกต้องแม่นยำสูง และเหมาะกับการตรวจหายีนเกล็ดเลือดแอนติเจน สำหรับประเทศกำลังพัฒนา แต่มีข้อจำกัดคือไม่เหมาะกับงานตรวจคัดกรองจำนวนมาก ส่วนวิธี Simple-Probe เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจคัดกรองจำนวนมาก แต่ยังต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และน้ำยาราคาแพง รวมถึงบุคลากรต้องมีการฝึกฝนให้เกิดความชำนาญ และมีข้อจำกัดในการแปลผลหากมี SNP อื่นใกล้คำแหน่งของ HPA SNP ดังนั้นการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดแอนติเจน ควรใช้ 2 วิธีที่มีชุดไพรเมอร์ที่แตกต่างกันเพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด

Copyright by Mahidol University

161 หน้า