Thesis Title Comparison of Frequency of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 Alleles between Leprosy Patients and Normal Controls in Northern Thailand

Author Miss Donruedee Wongkuttiya

M. Sc. Microbiology

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Chairman
Asst. Prof. Dr. Umnat Mevatee	Member
Dr. Ampica Mangklabruks	Member
Dr. Nopporn Sittisombut	Member

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease of human caused by *Mycobacterium leprae*. The majority of infected individuals are asymptomatic, whereas some individuals develop various forms of disease which can be distinguished into two major poles by the differences in specific immune responses, clinical and histologic findings. Patients classified in the tuberculoid leprosy pole show strong specific cellular immune response whereas lepromatous leprosy patients do not exhibit specific cell mediated immune response, but show good humoral immune response that is not protective. At the present, the factor(s) that plays a role in determining the susceptibility to leprosy and the development of different manifestations of leprosy is/are not yet known, but host factors, especially the HLA class II loci, may be involved. The purpose of this study was to determine and compare the frequencies of the HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles between leprosy patients and normal controls by using polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide (PCR-SS0) typing. With available probes, this typing method can distinguish 9 and 18 alleles, respectively, of the HLA-DQA1 gene and HLA-DQB1 gene. One hundred and forty-three leprosy patients and 120 normal controls were selected only from the northern Thai ethnic group. The PCR-SSO typing was performed by amplifying the polymorphic second exons of the HLA-DQA1 and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

HLA-DQB1 genes, hybridizing with digoxigenin-labeled DQA1 and DQB1 SSO probes, and detecting with the use of alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin and a chemiluminescent substrate. Among the 9 and 18 possible HLA-DQA1 and DQB1 alleles, 7 and 11 of them, respectively, were found in this northern Thai population. The alleles HLA-DQA1*0102, -DQA1*0101 and -DQB1*0502 were the most commonly found alleles. An unusual HLA-DQB1*0502 allele, which was able to hybridize to the DQB1 SSO 2603 probe, was detected in three individuals. Hardy-Weinberg analysis indicated that distribution of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genotypes were in equilibrium. Strong linkage disequilibrium of the HLA-DQA1 and -DQB1 alleles was observed in eleven haplotypes; many of these haplotypes were described previously in northern Chinese and Shanghai Chinese. None of the detected HLA-DQA1 and -DQB1 alleles was found either positively or negatively associated with leprosy or subtypes of leprosy. Our finding is different from those of Schauf et al. (1985) who found the association of HLA-DQw1 and -DR2 antigens with tuberculoid leprosy in northern Thais and may reflect the small sample sizes in their study. Thus, in the northern Thai population, the difference in HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genotypes may not influence the susceptibility to leprosy nor the development of various clinical forms of leprosy. However, further studies of the HLA-DR and -DP loci are still needed to determine the influence of these HLA class II loci on the development of leprosy.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปรียบเทียบความถี่การตรวจพบ HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีล ระหว่างผู้ป่วยโรคเรื้อนและคนปกติในภาคเหนือของประเทศไทย

ผู้เขียน นางสาว ดลฤดี วงศ์ขัตติยะ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

รศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. อำนาจ มีเวที	กรรมการ
พญ. อัมพิกา มังคละพฤกษ์	กรรมการ
นพ. นพพร สิทธิสมบัติ	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคเรื้อนเป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังในคน มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Mycobacterium leprae*. ผู้ที่ติดเชื้อส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ ในขณะที่บางคนมีอาการของโรคได้หลายรูปแบบ ซึ่งสามารถแบ่งอาการของโรค โดยอาศัยความแตกต่างของการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response), อาการทางคลีนิค และพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อ ได้ 2 กลุ่ม. กลุ่มแรกคือ โรคเรื้อนชนิดทูเบอร์คูลอยด์ (tuberculoid leprosy) ซึ่งมีการตอบสนองทางเซลล์แบบจำเพาะ (specific cellular immune response) อย่างเด่นชัด, ในขณะที่โรคเรื้อนชนิดเลปโปรมาตัส (lepromatous leprosy) ไม่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันทางเซลล์แบบจำเพาะ, แต่มีการตอบสนองทางสารน้ำ (humoral immune response) ที่ดี แต่เป็นชนิดที่ป้องกันโรคไม่ได้. ในปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อโรคเรื้อนแล้วเกิดโรคเรื้อนที่มีรูปแบบที่แตกต่างกัน. เคยมีผู้เสนอความคิดเห็นว่าความแตกต่างของปัจจัยภายในของผู้ที่ถูกติดเชื้อ (host factor) อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดอาการของโรคเรื้อนที่แตกต่างกัน. ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบความถี่ของ HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีล ระหว่างผู้ป่วยโรคเรื้อนและคนปกติ โดยวิธี polymerase chain reaction ร่วมกับ sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) hybridization การหา HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีล โดยการใช้ probe ที่มีอยู่ ซึ่งสามารถแยกยีน HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 ได้ 9 และ 18 อัลลีล, ตามลำดับ. ในการศึกษาครั้งนี้, คัดเลือกกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อนจากคนไทยภาคเหนือจำนวน 143 คน และ กลุ่มคนปกติจากคนไทยภาคเหนือจำนวน 120 คน มาทำการตรวจหา HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีล โดยวิธี PCR-SSO hybridization เทคนิค ซึ่งทำได้โดยการเพิ่มจำนวนยีนของ HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 บริเวณ exon ที่สอง ซึ่งมีความหลากหลายมาก จากนั้นนำไป hybridize กับ HLA-DQA1 และ -DQB1 probes ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin และใช้ แอนติบอดี้ต่อ degoxigenin (anti-digoxigenin) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase enzyme) ร่วมกับการใช้ chemiluminescent substrate. ผลการตรวจพบว่าในกลุ่ม HLA-DQA1 9 อัลลีล และ HLA-DQB1 18 อัลลีลที่สามารถตรวจพบได้, มี HLA-DQA1 7 อัลลีล และ HLA-DQB1 11 อัลลีล ที่พบในกลุ่มประชากรในภาคเหนือของประเทศไทย. อัลลีลที่พบมากที่สุดคือ อัลลีล HLA-DQA1*0102, -DQA1*0101 และ -DQB1*0502. ในกลุ่มประชากรนี้พบว่ามี 3 คนที่มี HLA-DQA1*0502 อัลลีลที่ผิดปกติ โดยที่อัลลีลนี้สามารถ hybridize ได้กับ DQB1 SSO 2603 probe. การวิเคราะห์แบบ Hardy-Weinberg พบว่า การกระจายตัวของ HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 genotype อยู่ในภาวะสมดุล. นอกจากนี้ยังพบว่า HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีล มี linkage disequilibrium กันอย่างมากเป็นจำนวน 11 haplotypes โดยที่ haplotype เหล่านี้เคยพบในกลุ่มคนจีนทางตอนเหนือ และคนจีนในเซี่ยงไฮ้มาแล้ว การหาความสัมพันธ์ระหว่าง HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 อัลลีลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อน และ กลุ่มคนปกติ ไม่พบว่ามีอัลลีลใดเลยที่มีความสัมพันธ์ทั้งในเชิงบวกและเชิงลบ. ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Schauf และคณะ (1985) ซึ่งพบว่า HLA-DQw1 และ HLA-DR2 แอนติเจน มีความสัมพันธ์กับโรคเรื้อนชนิดทูเบอร์คูลอยด์ในคนไทยภาคเหนือ ซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะเกิดจากการใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก. ดังนั้นความแตกต่างของ HLA-DQA1 และ HLA-DQB1 genotypes ในคนไทยภาคเหนือไม่น่าจะมีผลต่อการเกิดอาการของโรคเรื้อนที่แตกต่างกัน. อย่างไรก็ตามแนวทางการศึกษาต่อไปคือตรวจหาความสัมพันธ์ของ HLA - class II loci อื่น เช่น HLA-DR และ -DP กับการเกิดโรคเรื้อน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved