นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาชนิดแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่ส่งตรวจที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

อรรถพล ศรีสุดดี[1] ภาวิณี คุปตวินทุ[1] ชาย ฤกษ์ชัย[1] กรนรินทร์ อินอร[1] ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ[1]
อ้อยทิพย์ ณ ถลาง[2] และ อุบลวัณณ์ จรูญเรืองฤทธิ์[1]
[1]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย [2]คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

การเกิด alloantibodies ต่อแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดมีความสำคัญในผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ การตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อทั้ง human leukocyte antigens; HLA และ human platelet antigens; HPA ช่วยในการวินิจฉัยภาวะเกล็ดเลือดต่ำ และการจัดหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้และเหมาะสมให้กับผู้ป่วย ผู้วิจัยทำการศึกษาข้อมูลย้อนหลังของผู้ป่วยที่ส่งตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ ผู้ป่วยทารกแรกคลอดที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ จำนวน 34 ราย และผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ จำนวน 508 ราย ผู้ป่วยที่พบแอนติบอดีด้วยวิธี solid phase red cell adherent assay (SPRCA) จะตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีด้วยเทคนิค monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) ผลการศึกษาจากการตรวจด้วยวิธี SPRCA พบว่า ผู้ป่วยทารกแรกคลอดพบแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 14 ราย นอกจากนี้รายที่ซีรัมมารดาให้ผลลบจำนวน 20 ราย เมื่อทดสอบ crossmatch กับเกล็ดเลือดบิดาให้ผลบวกจำนวน 5 ราย ซึ่งมีสาเหตุจากแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 3 ราย แอนติบอดีชนิด unidentified antibody จำนวน 1 ราย และอีก 1 รายมีสาเหตุจากหมู่เลือด ABO เข้ากันไม่ได้ กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่ตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธี SPRCA จำนวน 324 ราย เป็นแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 273 ราย รองลงมาคือแอนติบอดีต่อ HLA ร่วมกับ HPA จำนวน 43 ราย และแอนติบอดีต่อ HPA จำนวน 8 ราย ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการแยกชนิดของแอนติบอดีเพิ่มเติมด้วยวิธี MAIPA ร่วมกับการตรวจจีโนไทป์ของ HPA ในกลุ่มผู้ป่วยที่พบแอนติบอดีต่อทั้ง HLA และ HPA พบว่า สามารถระบุความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HPA ของผู้ป่วยได้จำนวน 14 ราย โดยสรุป ผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำส่วนใหญ่พบเป็นแอนติบอดีต่อ HLA แต่ผู้ป่วยที่พบว่ามีแอนติบอดีต่อ HPA ร่วมกับ HLA ควรตรวจจีโนไทป์ของ HPA เพิ่มเติมเพื่อช่วยในการแปลผลชนิดของแอนติบอดีต่อ HPA ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคและการจัดหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมและปลอดภัยให้กับผู้ป่วย

คำสำคัญ : ● *Human platelet antibody detection* ● *Human leukocyte antigens* ● *Human platelet antigens*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:183-9.

Original Article

A Study of Platelet Antibody Detection in Patients at the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Atthapol Srisuddee[1], Pawinee Kupatawintu[1], Chai Roekchai[1], Kornnarin Inorn[1], Sirilak Phiancharoen[1], Oytip Nathalang[2] and Ubonwon Charoonruangrit[1]
[1]National Blood Centre, Thai Red Cross Society; [2]Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Abstract:

Alloantibodies directed against platelet surface antigens are clinically important, especially in patients with thrombocytopenia. Detection of antibody specific to human leukocyte antigens (HLA) and human platelet

ได้รับต้นฉบับ 1 กรกฎาคม 2559 รับลงตีพิมพ์ 18 สิงหาคม 2559
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวภาวิณี คุปตวินทุ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
E-mail:pawinee.k@redcross.or.th

antigens (HPA) is helpful for the diagnosis and finding compatible platelets. This retrospective study aimed to determine antibody against platelet surface antigens found in patients whose samples were sent to test at the National Blood Centre, Thai Red Cross Society. They were divided into 2 groups: 34 FNAIT and 508 patients with thrombocytopenia. Positive antibody testing by solid phase red cell adherent assay (SPRCA), monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) was additionally performed to identify HPA antibody specificity. Regarding antibody detection by SPRCA, it was found that 14 FNAIT had HLA antibodies; while, the others were negative. When paternal platelet crossmatch was performed in these 20 maternal sera, 5 samples were positive consisting of 3 HLA antibodies, 1 unidentified antibody and 1 ABO incompatibility. Among 324 thrombocytopenic patients with positive platelet antibodies tested by SPRCA, 273 were HLA antibodies, followed by 43 of combined HLA and HPA antibodies, and 8 were HPA antibodies, respectively. According to additional testing for HPA antibody specificities using MAIPA and HPA genotyping, we found that antibody specific to HPA could be identified in 14 patients who had combined HLA and HPA antibodies. In conclusion, the most common antibodies found in patients with thrombocytopenia were HLA antibodies. However, HPA genotyping is suggested in patients who had combined HLA and HPA antibodies to provide definitive diagnosis and appropriate platelet transfusions.

Keywords : ● *Human platelet antibody detection* ● *Human leukocyte antigens* ● *Human platelet antigens*
J Hematol Transfus Med 2016;26:183-9.

บทนำ

การเกิด alloimmunization ต่อแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวเกล็ดเลือดทั้ง human leukocyte antigens (HLA) และ human platelet antigens (HPA) ทำให้เกิดปัญหาสำคัญทางคลินิกในผู้ป่วยคือ fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT), post transfusion purpura (PTP) และ platelet transfusion refractoriness (PTR)[1,2] สำหรับ FNAIT นั้นทารกมีเกล็ดเลือดต่ำซึ่งเป็นผลจากมารดาสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของทารก เนื่องจากแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเป็นชนิด IgG จึงสามารถผ่านรกไปยังทารกในครรภ์ทำให้เกิด antenatal และ neonatal thrombocytopenia ได้ ส่วนผู้ป่วย PTP หรือ PTR ซึ่งมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) อาจเกิดจากการได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือดบ่อยครั้งทำให้ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดบนเกล็ดเลือดของผู้บริจาค อีกทั้งอัตราการเกิด platelet refractoriness พบได้สูงร้อยละ 40-70 ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาต่อเนื่องด้วย platelet transfusions โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัด และผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด[1-4]

การทดสอบเพื่อช่วยในการวินิจฉัย FNAIT, PTP และ PTR นั้น ไม่ได้เป็นการตรวจประจำในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดเพราะต้องใช้เทคนิคการตรวจที่ซับซ้อนและอาศัยประสบการณ์ของผู้ทำการทดสอบ เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดมีหลายวิธีได้แก่ solid phase red cell adherent assay (SPRCA), flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) เป็นต้น[5-8] ซึ่งแต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน การตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดส่วนใหญ่ใช้วิธี SPRCA และ flow cytometry ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการสามารถคัดเลือก panel cells ที่ทราบชนิดของแอนติเจน HLA และ HPA มาใช้ในการทดสอบได้เอง[9,10] ส่วนวิธี ELISA และ MAIPA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงและใช้เป็นวิธีมาตรฐานนั้นเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ผลิตโดยบริษัทต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง และเหมาะสมกับการตรวจตัวอย่างพร้อมกันหลายราย กรณีที่ต้องการยืนยันผลชนิดของแอนติบอดีต่อ HLA และ/หรือ HPA จะต้องมีการตรวจจีโนไทป์ของ HLA และ/หรือ HPA เพิ่มเติม[1-3,11]

ห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ให้บริการตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดและตรวจ platelet crossmatch ให้กับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจากการได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือดบ่อยครั้งตั้งแต่ พ.ศ. 2536[12] ต่อมาได้รายงานการศึกษาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำซึ่งได้ส่งตัวอย่างมาตรวจที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ พบว่าการสร้าง alloimmune antibodies พบได้บ่อยในกลุ่มผู้ป่วย myeloproliferative disorders ส่วนใหญ่เป็น

แอนติบอดีต่อ HLA มากกว่าแอนติบอดีต่อ HPA คือ ร้อยละ 49.69 และ 6.13 ตามลำดับ ส่วนการจัดหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมเลือกใช้เป็น HLA matched platelet ร่วมกับการทำ platelet crossmatch เท่านั้น[9] ปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการได้พัฒนาวิธีการตรวจจีโนไทป์ของ HPA ด้วยวิธี multiplex PCR และการใช้ชุดน้ำยาต่างประเทศตรวจด้วยวิธี real time PCR[11] เพื่อช่วยในการแปลผลแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่จำเป็นต้องใช้ single donor platelets ที่เหมาะสมและเข้ากันได้กับผู้ป่วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาชนิดของแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ตรวจพบในผู้ป่วย ที่ส่งตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วิธีการศึกษา

ทำการศึกษาย้อนหลังโดยรวบรวมข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยที่ส่งตรวจชนิดแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึง 10 กันยายน พ.ศ. 2558 จำนวนทั้งหมด 542 ราย โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างของมารดาที่ทารกแรกคลอดมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (FNAIT) จำนวน 34 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจำนวน 508 ราย เป็นเพศชายจำนวน 241 รายและเพศหญิง จำนวน 267 ราย

การตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดด้วยวิธี SPRCA

ศึกษาผลการตรวจของแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่ตรวจด้วยเทคนิค SPRCA ซึ่งประยุกต์จากวิธีของภาวิณีและคณะ[9] และ Lown และคณะ[13] โดยใช้ microtiter U plate ที่เคลือบด้วย polyclonal rabbit anti human thrombocyte (Dako, Glostrup, Denmark) ร่วมกับเซลล์เกล็ดเลือดมาตรฐานซึ่งทราบชนิดของแอนติเจนเกล็ดเลือดทั้ง HLA class I และ HPA ที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70°C รายละเอียดของเซลล์เกล็ดเลือดมาตรฐานดังแสดงใน Table 1 โดยนำมาเตรียม platelet suspension เป็น untreated และ chloroquine treated (HLA antigen removed) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยและแยกชนิดว่าเป็นแอนติบอดีต่อ HLA และ/หรือ HPA ขณะเดียวกันใช้เซลล์เกล็ดเลือดของผู้ป่วย (untreated platelet suspension) ทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยเพื่อตรวจหา platelet associated immunoglobulin การอ่านผลการทดสอบจะพิจารณาการกระจายตัวของ sensitized red cells หากพบว่าเม็ดเลือดแดงมีการกระจายตัวแสดงว่าเป็นผลบวก หากเม็ดเลือดแดงตกลงเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมแสดงว่าเป็นผลลบ

สำหรับกรณีกลุ่ม FNAIT ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ซีรัมของมารดาทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์เกล็ดเลือดของบิดาทั้ง untreated และ chloroquine treated platelets เพื่อประเมินว่ามีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดของบิดาซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำในทารกได้

การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อชนิดของแอนติเจนบนเกล็ดเลือด

กลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบ platelet specific antibody จะทำการทดสอบเพิ่มด้วยเทคนิค MAIPA ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ Kiefel และคณะ[4] ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหา platelet specific antibody ที่สามารถแยกความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อชนิดของแอนติเจนบนเกล็ดเลือด โดยนำเซลล์เกล็ดเลือดที่ทราบชนิดของแอนติเจนมาทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยหลังจากนั้นปั่นล้างเพื่อกำจัด excess antibody แล้วนำมาทำปฏิกิริยาร่วมกับ mouse anti-human monoclonal antibody (MoAb) ที่มีความจำเพาะกับกลุ่ม glycoprotein ต่างๆ บนเกล็ดเลือดประกอบด้วย MoAb

Table 1 Panel cells for platelet antibody testing by SPRCA

Donor ID	HPA															HLA
	IIIa		Ib alpha		IIb		IIIa		Ia		IIIa		CD109		IV	
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b	Nak[a]	
1004501383	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	A24, A33, B7, B44
1004514715	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	A2, -, B60, B46
1003714424	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	A2, A24, B51, B56
1005647138	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	NT	A24, A33, B44, B75
2014200001	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	A24, A74, B51, B57
1003121307	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	A2, A24, B18, B55
1004317525	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	A11, A11, A60, A58
1004756907	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	A11, A31, B51, B51

P2 (Beckman Coulter, Villepinte, France) ที่จำเพาะกับ glycoprotein IIb/IIIa (HPA-1, -3, -4 และ -6), MoAb Gi9 (Beckman Coulter, Villepinte, France) ที่จำเพาะกับ glycoprotein Ia/IIa (HPA-5), MoAb AK2 (AbD serotec, Oxford, UK) ที่จำเพาะกับ glycoprotein IX (HPA-2), MoAb TEA2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ที่จำเพาะกับแอนติเจน CD109 (HPA-15), MoAb FA6.152 (GeneTex, Irvine, CA, USA) ที่จำเพาะกับ glycoprotein IV (แอนติเจน Nak) และ MoAb W6/32 (Dako, Glostrup, Denmark) ที่จำเพาะกับ beta2 microglobulin (HLA class I antigens) และทำปฏิกิริยาโดยใช้หลักการของ conventional ELISA ที่เคลือบด้วย goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) ใน microtiter F plate และอ่านสีปฏิกิริยาระหว่าง horseradish peroxidase-labeled goat anti-human IgG (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) และ OPD substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

การตรวจหาชนิดของ HPA

ได้ทำการตรวจชนิดแอนติเจนเกล็ดเลือด ในระบบ HPA-1 ถึง HPA–11, HPA-13 ถึง HPA-15 และ HPA-17 ด้วยเทคนิค real time PCR (Simple® Probes) โดยใช้ชุดน้ำยา LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ร่วมกับ LightSNiP HPA specific probes และ primers (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง LightCycler® 480 Real-Time PCR System และแปลผลด้วยการอ่านค่า melting temperature (Tm) ของแต่ละแอนติเจนของ HPA[11]

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั่วไปและชนิดของแอนติบอดีที่ตรวจพบในกลุ่มผู้ป่วยมาวิเคราะห์โดยจำแนกข้อมูลตามความถี่และร้อยละ

ผลการศึกษา

ได้ทำการศึกษาโดยรวบรวมข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยที่ส่งตรวจชนิดแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 542 ราย โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างของมารดาที่ทารกแรกคลอดมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (FNAIT) จำนวน 34 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ จำนวน 508 รายซึ่งมีช่วงอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 100 ปี ส่วนใหญ่ผู้ป่วยกลุ่มนี้อยู่ในช่วงอายุมากกว่า 55 ปี (41.73%) ดังแสดงใน Figure 1

กลุ่มผู้ป่วย FNAIT นั้นเมื่อตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี SPRCA พบว่ามารดามีแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 14 ราย (41.18%) และให้ผลลบต่อแอนติบอดีของแอนติเจน HLA และ HPA จำนวน 20 ราย (58.82%) อีกทั้งทุกรายไม่พบแอนติบอดีต่อ platelet associated immunoglobulin สำหรับซีรัมมารดาจำนวน 20 รายที่ให้ผลลบนั้น เมื่อทดสอบ crossmatch โดยใช้ซีรัมมารดากับเกล็ดเลือดของบิดา พบผลบวกจำนวน 5 รายและ

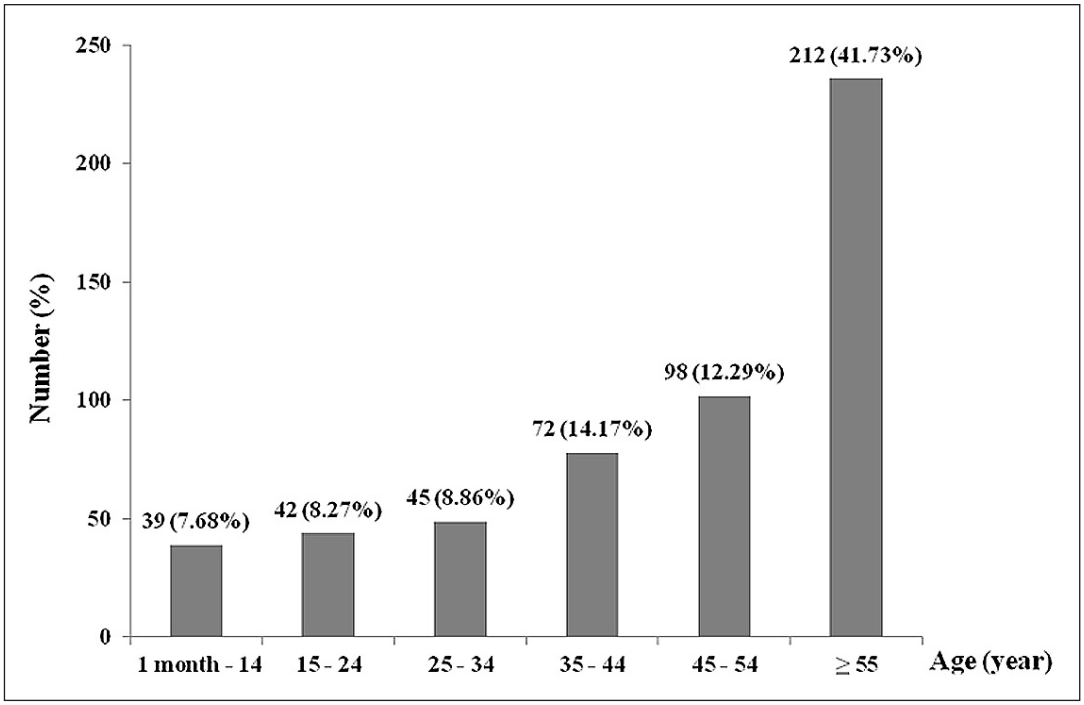

Figure 1 Age ranges in patients with thrombocytopenia (n = 508)

Table 2 Antibody specificity in patients with thrombocytopenia tested by SPRCA, MAIPA and HPA genotyping (n = 324)

Antibody	Number of patients tested by		
	SPRCA	MAIPA	HPA genotyping
HLA	273	Not tested	Not tested
HLA+HPA	43	43*	33
HPA	8	8**	8

SPRCA: solid phase red cell adherent assay; MAIPA: monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens

* HLA+HPA positive = 17; HLA positive only = 24; HPA positive only = 1, negative = 1

** HPA positive only = 5, negative = 3

ผลลบจำนวน 15 ราย รายที่ให้ผลบวกนั้นได้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA ในซีรัมมารดาเพิ่มเติมโดยใช้ solid-phase assays (Luminex®multiplex platform) ทดสอบซีรัมกับน้ำยา LAB-Screen® Mixed (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) พบว่าให้ผลบวกซึ่งเกิดจากแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 3 ราย แอนติบอดีชนิด unidentified antibody จำนวน 1 ราย และให้ผลลบจำนวน 1 รายซึ่งมีสาเหตุจากหมู่เลือด ABO เข้ากันไม่ได้ (มารดาหมู่เลือด O บิดาหมู่เลือด A และทารกหมู่เลือด A)

ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจำนวน 508 รายพบว่าผลการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี SPRCA ให้ผลบวกจำนวน 324 ราย (63.78%) และให้ผลลบจำนวน 184 ราย (36.22%) สำหรับรายที่ให้ผลบวกมีแอนติบอดีต่อ HLA จำนวน 273 ราย มีแอนติบอดีต่อ HPA จำนวน 8 ราย และให้ผลบวกต่อแอนติบอดีทั้งแอนติเจน HLA และ HPA จำนวน 43 ราย กรณีผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อ HLA ทางห้องปฏิบัติการได้คัดเลือกเกล็ดเลือดหมู่ ABO ที่ตรงกันหรือเข้ากันได้และมีผลการตรวจ platelet crossmatch ที่เข้ากันได้ให้กับผู้ป่วย หรือจัดหา HLA matched platelet ให้กับผู้ป่วย

ส่วนกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 43 รายที่มีแอนติบอดีต่อ HPA และ/หรือ HLA เมื่อตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี MAIPA พบว่า ผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีทั้งต่อแอนติเจน HLA และ HPA สามารถแยกชนิดเป็นแอนติบอดีต่อทั้งแอนติเจน HLA และ HPA จำนวน 17 ราย แอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA อย่างเดียว จำนวน 24 ราย แอนติบอดีต่อแอนติเจน HPA อย่างเดียว จำนวน 1 รายและให้ผลลบจำนวน 1 ราย อีกทั้งได้ตรวจจีโนไทป์ของ HPA เพิ่มเติมจำนวน 33 ราย ส่วนกรณีของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจน HPA อย่างเดียว จำนวน 8 รายผลการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี MAIPA ให้ผลบวกต่อแอนติเจน HPA จำนวน 5 รายและให้ผลลบจำนวน 3 ราย ผู้ป่วยทั้ง 8 รายได้ตรวจจีโนไทป์ของ HPA เพิ่มเติมรายละเอียดดังแสดงใน Table 2

Table 3 Antibody specificity results obtained by MAIPA and HPA genotyping in patients with thrombocytopenia (n = 18)

Possible antibody specificity	Number
HLA+HPA-1b, -2b	2
HLA+HPA-1b, -6b	1
HLA+HPA-3b	2
HLA+HPA-4b	1
HLA+HPA-4b, -15b	1
HLA+HPA-5b	2
HLA+HPA-5b, -6b	1
HLA+HPA-6b	1
HLA+GP Ia/IIa	1
HLA+GP IIb/IIIa	1
HLA+unidentified	4
GP IIb/IIIa	1
Total	**18**

เมื่อพิจารณาผลการแยกชนิดของแอนติบอดีด้วยวิธี MAIPA ร่วมกับการตรวจจีโนไทป์ของ HPA ในผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีทั้งต่อแอนติเจน HLA และ/หรือ HPA จำนวน 18 รายสามารถระบุความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HPA ได้จำนวน 14 รายและเป็นแอนติบอดีที่เป็น unidentified จำนวน 4 ราย ดังแสดงใน Table 3 สำหรับผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจน HPA อย่างเดียวด้วยวิธี SPRCA จำนวน 8 รายแต่ให้ผลบวกต่อแอนติเจน HPA ด้วยวิธี MAIPA เพียง 5 รายเท่านั้นและเมื่อพิจารณาผลร่วมกับการตรวจจีโนไทป์ของ HPA สามารถระบุความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HPA ได้เป็น แอนติบอดีต่อ GPIIb/IIIa จำนวน 3 ราย แอนติบอดีต่อ GPIIb/IIIa+Ia/IIa จำนวน 1 ราย และแอนติบอดีต่อ CD 36 (Nak[a] antigen) จำนวน 1 ราย

วิจารณ์

ภาวะ immune-mediated thrombocytopenia ที่เกิดจาก alloantibodies หรือ autoantibodies ต่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่เป็นสาเหตุของ FNAIT, PTP และ PTR นั้น การหาสาเหตุและการวินิจฉัยโรคต้องอาศัยผลการทดสอบเพื่อแยกชนิดของแอนติบอดีซึ่งอาจเป็นแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบ ABO กรณีนี้ธนาคารเลือดต้องจัดหาเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคที่เป็น ABO compatible ให้กับผู้ป่วย สำหรับผู้ป่วยที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA และ/หรือ HPA อาจต้องตรวจจีโนไทป์ของ HLA และ/หรือ HPA ทั้งของผู้ป่วยและผู้บริจาคเพื่อจัดหาเกล็ดเลือดที่เป็น HLA-matched หรือ HPA-matched platelets และมีผล platelet crossmatch เข้ากันได้กับผู้ป่วย[14,15]

การศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมข้อมูลผลการตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในมารดาของทารกที่มีปัญหา FNAIT และผู้ป่วยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำ สำหรับกลุ่มผู้ป่วย FNAIT ซีรัมมารดาตรวจพบแอนติบอดีต่อ HLA สูงถึงร้อยละ 48.48 ทารกกลุ่มนี้หากจำเป็นต้องใช้เกล็ดเลือด อาจเตรียมเกล็ดเลือดจากมารดาแต่ต้องมีการตรวจเชื้อต่างๆ ที่อาจถ่ายทอดจากการให้เลือดหรืออาจเตรียมเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจน HLA ตรงกับแอนติบอดีที่ตรวจพบในซีรัมมารดา[1,16] นอกจากนี้กลุ่มที่ผลการตรวจด้วยวิธี SPRCA ให้ผลลบ เมื่อศึกษาผลการตรวจหมู่เลือด ABO ของทารก มารดาและบิดาพบว่า มี ABO incompatibility จำนวน 1 ราย ดังนั้นการเกิด FNAIT ของผู้ป่วยรายนี้อาจเกิดจาก ABO antibodies ชนิด IgG ซึ่งมีข้อควรระวังในการให้เกล็ดเลือดสำหรับกรณีนี้คือ ต้องให้เกล็ดเลือดหมู่ ABO ที่เข้ากันได้กับทารกและไม่มีแอนติเจน A และ/หรือ B ที่ตรงกับแอนติบอดีในซีรัมมารดา[1,3] อีกทั้งการตรวจ IgG ABO antibody titers ในซีรัมของมารดาอาจช่วยในการวินิจฉัยและพิจารณาการรักษาที่เหมาะสมได้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีภาวะ severe intracranial hemorrhage[17]

จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบแอนติบอดีต่อ HLA และไม่พบแอนติบอดีต่อ HPA ในซีรัมมารดา ผลที่ได้อาจแตกต่างจากรายงานของต่างประเทศซึ่งพบอุบัติการณ์ของ FNAIT ที่เกิดจาก anti-HPA-1a ได้บ่อย[1,2] ทั้งนี้เพราะแอนติเจนของ HLA เป็น high immunogenicity อีกทั้งพบความถี่ของแอนติเจน HPA-1a negative (HPA-1b1b) ในคนไทยน้อยกว่าคนผิวขาว[11,18,19] การเตรียมเกล็ดเลือดให้ทารกในกรณีที่มารดาสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ของทารกอาจเตรียมจากมารดาได้หรืออาจเตรียมเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจน HLA ตรงกับแอนติบอดีที่พบในซีรัมมารดาและผลการตรวจ platelet crossmatch เข้ากันได้[1]

เมื่อจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำตามช่วงอายุพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุมากกว่า 55 ปี ซึ่งอาจเป็นเพราะผู้ป่วยสูงอายุมีโอกาสได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือดบ่อยครั้งทำให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนหมู่เลือดซึ่งรวมทั้งแอนติเจน HLA และ HPA ได้บ่อยกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยและไม่มีประวัติการได้รับเลือด[1,4,9] ดังนั้นการให้เกล็ดเลือดกรณีที่ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อ HLA ต้องคัดเลือกเป็น HLA-matched platelet ให้กับผู้ป่วยเพื่อลดปัญหา PTP และ PTR ซึ่งส่วนใหญ่การให้เกล็ดเลือดเกรดที่ดีที่สุดคือ เกรด A: 4 antigen-match (HLA-A และ HLA-B) แต่หากไม่สามารถหาเกล็ดเลือดชนิดเกรด A ได้ การใช้เกล็ดเลือดชนิดเกรด B1U: 1 antigen unknown or blank หรือ B2U: only 2 antigens detected in donor; both present in recipient ก็สามารถให้กับผู้ป่วยได้เพราะการตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดไม่ต่างจากการให้เกล็ดเลือดที่เป็นเกรด A[1,20] สำหรับกรณีที่ผู้ป่วยตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจน HPA จำนวน 8 รายด้วยวิธี SPRCA แต่เมื่อตรวจเพิ่มเติมด้วยเทคนิค MAIPA ให้ผลบวกเพียง 5 ราย อาจเกิดจากแอนติบอดีอาจมีคุณสมบัติเป็น low-avidity ทำให้เกิดผลลบปลอมจากสาเหตุในขั้นตอนการล้างเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของต่างประเทศในกรณีการตรวจ HPA-1a alloantibodies[21] นอกจากนี้ปัจจุบันการตรวจจีโนไทป์ของ HPA จะช่วยในการสรุปและยืนยันผลของชนิดของแอนติบอดีได้ดีกว่าการตรวจฟีโนไทป์ เพราะแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ HPA แต่ละชนิดหายากและไม่มีจำหน่าย จากการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจจีโนไทป์ของ HPA เพิ่มเติมในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจำนวน 33 ราย พบว่า ผู้ป่วยจำนวน 14 ราย สามารถจำแนก possible antibodies ต่อ HPA ได้ (Table 3) ทำให้สามารถคัดเลือกเกล็ดเลือดผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจน HPA ตรงกับแอนติบอดีของผู้ป่วยเพื่อนำมา crossmatch ต่อไป แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการตรวจความแรงของ HPA alloantibodies ชนิด IgG ในผู้ป่วย อาจช่วยในการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคทั้ง FNAIT, PTP และ PTR[15] จึงควรมีการศึกษาเรื่องนี้เพิ่มเติมต่อไป

สรุป

การจัดหาเกล็ดเลือดให้กับผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดทั้งกรณี FNAIT, PTP และ PTR นั้นควรพิจารณาผลการจำแนกชนิดของแอนติบอดีซึ่งอาจเป็นแอนติบดีที่จำเพาะต่อหมู่เลือด ABO และ/หรือแอนติบอดีต่อ HLA และ/หรือแอนติบอดีต่อ HPA ในผู้ป่วย ทั้งนี้การตรวจเพื่อหาสาเหตุและคัดเลือกเกล็ดเลือดผู้บริจาคที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยนอกจากจะตรวจแอนติบอดีด้วยวิธีทาง

ซีโรโลยี ควรต้องตรวจจีโนไทป์ของ HLA และ/หรือ HPA ควบคู่ไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการรักษาผู้ป่วย

อย่างไรก็ตามการป้องกันการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดด้วยการให้เลือด และส่วนประกอบของเลือดที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงโดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาต่อเนื่องด้วย platelet transfusion เพื่อลดอัตราการสร้างแอนติบอดีต่อ HLA ในผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. *Curtis BR. Platelet and granulocyte antigens and antibodies. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff M, eds. Technical manual. 18th ed. Bethesda: Am Assoc Blood Banks 2008:453-74.*
2. *Curtis BR. Human platelet antigens-2013. Vox Sang 2014;106: 93-102.*
3. *Norfolk D. Handbook of transfusion medicine. United Kingdom Blood Services. 5th ed. TSO publishing & solutions. (available online www.tsoshop.co.uk, cited on 15/05/2016).*
4. *Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. Transfusion 2001;41:766-70.*
5. *Levin M, de Veld JC, van der Holt B, van't Veer MB. Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. Transfusion 2003;43: 72-7.*
6. *Allen DL, Chapman J, Phillips PK, Ouwehand WH. Sensitivity of the platelet immunofluorescence test (PIFT) and the MAIPA assay for the detection of platelet-reactive alloantibodies: a report on two U.K. National Platelet Workshop Exercises. Transfus Med 2001;4:157-64.*
7. *Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Muller-Eckhadt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood 1987;70:1722-6.*
8. *Shibata Y, Juji T, Nishizaw Y, Sakamoto H, Ozawa N. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed passive agglutination with platelets. Vox Sang 1981;41:25-31.*
9. *Kupatawintu P, Jitjak N, Saelee S, O-Charoen R, Nathalang O. The incidence of platelet antibody in thrombocytopenic patients. Thai J Hematol Transfus Med 2000;10:123-7.*
10. *Promwong C, Buakaew J. Prevalence and diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using flow cytometry. J Hematol Transfus Med 2010;20:179-89.*
11. *Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Srisuddee A, Chantratita W, Nathalang O. Comparison of a simple-probe real-time PCR and multiplex PCR techniques for HPA-1 to HPA-6 and HPA-15 genotyping. J Clin Lab Anal 2015;29:94-9.*
12. *O-Charoen R, Kupatawintu P, Jitjak N, Saelee S. Human platelet-specific alloantigens: phenotype frequency in Thai blood donors. Thai J Hematol Transfus Med 1993;3:27-35.*
13. *Lown J, Ivey J. Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Transfus Med 1991;1: 163-7.*
14. *Heikal NM, Smock KJ. Laboratory testing for platelet antibodies. Am J Hematol 2013;88:818-2.*
15. *Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. Blood Transfus 2015;13:380-90.*
16. *Roberts I. Prenatal and childhood transfusions. In: Murphy MF, Pamphilon DH, eds. Practical Transfusion Medicine. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:97-118.*
17. *Ueda H, Sugiura T, Katano K, Matsuhashi M, Kato S, Ito K, et al. Perinatal management of neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with anti-group A antibody. Transfus Med 2015;25:42-6.*
18. *Kupatawintu P, Nathalang O, O-Charoen R, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. Immunohematology 2005;21:5-9.*
19. *Kupatawintu P, Nathalang O. Platelet antigens: detection and role in transfusion. J Hematol Transfus Med 2016;26:85-90.*
20. *Dzik S. How I do it: platelet support for refractory patients. Transfusion 2007;47:374-8.*
21. *Socher I, Andrei-Selmer C, Bein G, Kroll H, Santoso S. Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology. Transfusion 2009;49:943-52.*