บทความฟื้นวิชา

Platelet transfusion refractoriness

เจนจิรา กิตติวรภัทร
ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

การให้เกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีระดับเกล็ดเลือดต่ำหรือมีการทำงานของเกล็ดเลือดผิดปกติมีความจำเป็นต่อ hemostasis ในด้านการรักษาหรือการป้องกันภาวะเลือดออกจากการทำงานที่ลดลงของไขกระดูกหรือก่อนการทำหัตถการ ผลิตภัณฑ์เกล็ดเลือดที่นำมาให้สามารถเตรียมได้จากสองวิธีคือ whole blood ซึ่งมาจากผู้บริจาคสี่ถึงหกรายต่อหนึ่งยูนิตของเกล็ดเลือด หรืออีกวิธีหนึ่งคือจากการบริจาคเฉพาะส่วน (apheresis) ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธีแรกเพราะหนึ่งยูนิตเตรียมมาจากผู้บริจาคเพียงคนเดียวและมีปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำกว่า แม้ว่าการให้เกล็ดเลือดจะช่วยลดภาวะเลือดออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดหรือผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับเกล็ดเลือดเป็นประจำอาจมีภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดหรือ platelet transfusion refractoriness (PTR) เกิดขึ้นได้ ซึ่งแพทย์ผู้ดูแลควรต้องนึกถึงภาวะนี้เมื่อระดับเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นเท่าที่ควรจะเป็นภายหลังได้รับเกล็ดเลือด[1] การเกิด PTR สัมพันธ์กับผลการรักษาที่ไม่ดี ได้แก่เพิ่มความเสี่ยงของภาวะเลือดออกโดยไม่สัมพันธ์กับภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ลดอัตราการรอดชีวิตทั้งในผู้ป่วยทั่วไป และผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน[2] เพิ่มระยะเวลาการรักษาตัวในโรงพยาบาลและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น[3] การประเมินประสิทธิภาพและการตอบสนองต่อการได้รับเกล็ดเลือดของผู้ป่วยควรทำควบคู่กันทั้งอาการด้านคลินิก เช่น เลือดหยุดดีหรือไม่ในผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกและด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. Post-transfusion increment (PI) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด โดยคำนวณจากปริมาณเกล็ดเลือดก่อนและหลังได้รับเกล็ดเลือดที่หนึ่งและ 24 ชั่วโมง เกล็ดเลือดควรเพิ่มขึ้น > 10 $x10^9$/L จึงจะบอกว่ามีการตอบสนองดีต่อการให้เกล็ดเลือด[4]

PI = Post-transfusion platelet count - pretransfusion platelet count

แม้ว่าวิธีนี้จะทำได้ง่ายเนื่องจากใช้เพียงแค่ระดับเกล็ดเลือดมาคำนวณแต่มีปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการตอบสนองของผู้ป่วย ได้แก่ จำนวนและคุณภาพของเกล็ดเลือดในถุงและปริมาณพลาสมาในร่างกายของผู้รับเกล็ดเลือด เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการคำนวณให้ละเอียดยิ่งขึ้นโดยนำปัจจัยเหล่านี้มาใช้

2. Percentage platelet recovery (R) การตรวจทางห้องปฏิบัติการต้องอาศัยจำนวนเกล็ดเลือดที่ผู้ป่วยได้รับและปริมาณเลือดของผู้ป่วย (total blood volume) ซึ่งจำนวนของเกล็ดเลือดที่ให้อาจแตกต่างไปในแต่ละที่ได้เล็กน้อย แต่โดยมาตรฐานจำนวนเกล็ดเลือดใน single donor platelet เท่ากับ 3 $x10^{11}$/L และ 5 $x10^{10}$/L ในแต่ละยูนิตของ platelet concentrate
การมี platelet recovery ที่ 67% ในผู้ป่วยทั่วไปจึงจะนับว่ามีการตอบสนองที่ดีต่อการได้รับเกล็ดเลือด โดยค่า 0.67 คือการประมาณร้อยละของปริมาณเกล็ดเลือดที่เหลือในกระแสเลือดหลังหัก pooling ในม้าม (~33%) หากมีค่า R > 30% ที่ 1-hour และ > 20% ที่ 24-hour หลังได้รับเกล็ดเลือดก็นับเป็นการตอบสนองที่ใช้ได้เช่นกัน[5]

$$R\ (\%) = \frac{PI\ (/L)\ x\ blood\ volume\ x\ 100\%}{\text{platelet transfused}\ (10^{11})}$$

3. Corrected count increment (CCI) นับเป็นการประเมินการตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดที่เป็นมาตรฐานและใช้ในเวชปฏิบัติอย่างแพร่หลาย โดยประเมินจากระดับเกล็ดเลือดที่ 1-hour และ 24-hour หลังได้รับเกล็ดเลือดคำนวณเทียบกับระดับก่อนได้รับ ตามสูตรดังนี้

$$CCI = \frac{PI\ (/L)\ x\ body\ surface\ area\ (m^2)}{platelet\ transfused\ (10^{11})}$$

ค่าของ 1-hour CCI > 7.5 $x10^9$/L และ 24-hour CCI > 4.5 $x10^9$/L จึงจะถือว่าผู้ป่วยมีการตอบสนองอย่างเหมาะสมต่อเกล็ดเลือดที่ให้[4,6] โดยแปลผลว่าการมีค่า CCI ที่ต่ำหรือมี PTR ที่หนึ่งชั่วโมงหลังได้รับเกล็ดเลือดมักจะเกิดจากการทำลายโดยแอนติบอดี (alloimmunization) แต่ถ้าหาก CCI ที่ชั่วโมงแรกปกติแต่มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่ 20-24 ชั่วโมงจะมาจากภาวะ peripheral consumption หรือ sequestration[7] อย่างไรก็ตามการประเมินการตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดจำเป็นต้องใช้เกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือด ABO ตรงกับผู้ป่วยเนื่องจากแอนติบอดีต่อ A (anti-A) และ B (anti-B) แอนติเจนจะสามารถทำลายเกล็ดเลือดได้[8] ตัวอย่างการศึกษาทางคลินิกที่นำ CCI มาใช้ประเมิน PTR เช่น The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group (TRAP)[9] ซึ่งเป็นการศึกษาการสร้าง alloantibody ในผู้ป่วย acute

myeloid leukemia ที่ได้รับยาเคมีบำบัดและได้ผลิตภัณฑ์เกล็ดเลือดที่เตรียมโดยวิธีต่างกัน ได้กำหนดให้ค่า 1-hour CCI < 5 x10^9/L เมื่อวัดสองครั้งขึ้นไปหลังได้รับเกล็ดเลือดหมู่เดียวกับผู้ป่วยแสดงถึงการมีภาวะ PTR

สาเหตุและอุบัติการณ์ของ platelet transfusion refractoriness

เมื่อผู้ป่วยได้รับการประเมินว่ามี PTR ควรต้องหาสาเหตุเสมอ โดยทั่วไปจะแบ่งเป็นสองสาเหตุได้แก่ สาเหตุจากแอนติบอดี (immune causes) และจากการใช้เกล็ดเลือดหรือการทำลายที่เพิ่มขึ้นที่ทำให้เกล็ดเลือดอายุสั้นลง (non-immune causes) ดังแสดงใน Table 1 หลักฐานจากการศึกษาในอดีตพบว่า non-immune causes พบได้บ่อยกว่าสาเหตุจากแอนติบอดีมาก โดยสาเหตุจาก immune พบเพียง < 20% ของ PTR ทั้งหมด[10,11] Doughty และคณะได้ทำการติดตามผู้ป่วยโรคมะเร็งทางโลหิตวิทยา 26 ราย ที่ได้รับเกล็ดเลือดจำนวน 266 ยูนิต พบภาวะ PTR ใน 116 ครั้ง (44%) ของการให้เกล็ดเลือดโดยคิดจาก platelet percentage recovery ในจำนวนนี้พบว่าร้อยละ 67 (78/116) มีสาเหตุที่ไม่สัมพันธ์กับแอนติบอดี เช่น การติดเชื้อ ไข้ เป็นต้น ขณะที่ภาวะตอบสนองไม่ดีต่อการให้เกล็ดเลือดที่มาจากการทำลายของแอนติบอดีเพียงอย่างเดียวพบเพียง 5 จาก 116 ครั้ง (4%)[11] สาเหตุจาก non-immune มักพบว่ามาจากภาวะทางคลินิกของผู้รับเกล็ดเลือด ได้แก่ ไข้ การติดเชื้อ ม้ามโต ภาวะเลือดออก disseminated intravascular coagulation (DIC) และยาเป็นต้น[11,12] จากการวิเคราะห์สาเหตุที่มาจาก non-immune ของ PTR ใน TRAP study พบว่า ไข้ (> 38.4°C) ภาวะเลือดออก การได้ยา heparin จำนวนครั้งที่ได้รับเกล็ดเลือด น้ำหนักตัวของผู้ป่วยสัมพันธ์กับการมี PTR (1-hour PI < 11 x10^9/L)[12] นอกจากนี้ DIC ไข้ การตรวจร่างกายพบม้ามโต การได้รับยา heparin หรือ amphotericin ยังสัมพันธ์กับ clinical response ที่ลดลงในผู้ป่วยที่มีระดับเกล็ดเลือดต่ำ[12]

สำหรับสาเหตุที่มาจาก immune cause พบได้น้อยกว่าแต่มีความสำคัญและเมื่อตรวจพบควรพิจารณาจัดหาเกล็ดเลือดที่มีผลตรวจความเข้ากันได้กับผู้ป่วยเพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อเกล็ดเลือดที่ได้รับ แอนติบอดีที่พบเป็นสาเหตุ ได้แก่ แอนติบอดีต่อ human leukocyte antigen (HLA), ที่พบน้อยกว่าคือ แอนติบอดีต่อ human platelet antigens (HPA), anti-NaK^a (CD36; glycoprotein IV) และแอนติบอดีต่อหมู่เลือด ABO

1. Human leukocyte antigen

HLA แอนติเจนประกอบด้วย glycoprotein ที่ประกอบจากโมเลกุลของ heavy chain ที่มีความหลากหลายสูง (polymorphism) กับ β2-microglobulin HLA แอนติเจนแสดงออกอยู่บนผิวเซลล์เกือบทั้งหมดที่มีนิวเคลียส เนื่องจากมีความสำคัญในการแยกแยะ ‘self’ และ ‘non-self’ และทำหน้าที่ช่วยในการนำเสนอแอนติเจนให้ระบบภูมิต้านทานสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ เกล็ดเลือดมีการแสดงออกของโมเลกุล HLA เฉพาะชนิด class I ซึ่งประกอบด้วย HLA-A, -B, และ -C ซึ่งการแสดงออกของแอนติเจนนี้มาจากที่สร้างโดยเกล็ดเลือดเองและบางส่วนได้รับจากพลาสมา[13] การแสดงออกของ HLA-C บนเกล็ดเลือดนั้นมีปริมาณไม่มากและโดยทั่วไปมักไม่พบเป็นสาเหตุของ PTR[14] HLA แอนติบอดีชนิด IgG ต่อ HLA-A หรือ HLA-B แอนติเจนพบเป็นสาเหตุถึงร้อยละ 80-90 ของ immune cause ของ PTR[15] ซึ่งเมื่อจับกับแอนติเจนที่ได้รับบนเกล็ดเลือดผู้บริจาคและจับกับ Fc receptor ของ macrophage ทำให้เกล็ดเลือดถูกทำลายในที่สุด

การสร้างแอนติบอดีต่อ HLA แอนติเจนเกิดได้จากการได้รับเลือด การตั้งครรภ์ และการปลูกถ่ายอวัยวะ ดังนั้นจึงควรซักประวัติเหล่านี้เสมอเมื่อพบ PTR โดยเฉพาะเมื่อสงสัยว่ามีสาเหตุจาก alloimmunization โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนยูนิตของเกล็ดเลือดที่ได้รับและปริมาณแอนติบอดี ผู้ป่วยอาจสร้างแอนติบอดีได้แม้ได้รับเลือดเพียงครั้งเดียวและในทางกลับกันในผู้ป่วยที่ต้องได้รับเลือดและเกล็ดเลือดหลายครั้งก็อาจไม่สร้างแอนติบอดี[15] นอกจากนี้ยังพบมีรายงานที่แอนติบอดีต่อ HLA ลดระดับลงจนตรวจไม่พบแม้ผู้ป่วยจะยังได้รับแอนติเจนชนิดนั้นๆ อยู่ตลอด ซึ่งอาจอธิบายได้จากการมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย เช่น การสร้างแอนติบอดีชนิด anti-idiotypic ต่อ HLA แอนติบอดี[16,17]

กลไกการสร้าง HLA แอนติบอดีเมื่อได้รับเกล็ดเลือดมีสอง

Table 1 Common causations of platelet transfusion refractoriness

Non-immune causes	Immune-related causes
Infection/sepsis	HLA antibodies
Fever	HPA antibodies (both auto- and alloantibodies)
Disseminated intravascular coagulation	Anti-CD36 antibodies
Splenomegaly	ABO antibodies
Drug-induced thrombocytopenia	Drug-dependent platelet antibodies

แบบ คือการกระตุ้นโดยตรง (direct allorecognition) และแบบผ่านระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับ (indirect allorecognition)[18,19] การกระตุ้นโดยตรงเกิดขึ้นเมื่อ T-cell receptor ของ CD4+ T-cell ในผู้รับเลือดพบกับโมเลกุล MHC class II บนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เป็น antigen presenting cell (APC) ที่มาจากถุงเกล็ดเลือด นำไปสู่การกระตุ้นและพัฒนา B-lymphocytes ไปเป็น plasma cells และสร้างแอนติบอดี การให้ผลิตภัณฑ์ชนิดกรองเม็ดเลือดขาว (leukoreduction) จะช่วยลดกลไกการกระตุ้นชนิดนี้ได้ สำหรับอีกกลไกอธิบายว่าการกระตุ้นเกิดขึ้นเมื่อ APC ของผู้รับเลือดสัมผัสกับโมเลกุล MHC class I บนเกล็ดเลือดของผู้บริจาคเช่นเดียวกับเมื่อระบบภูมิต้านทานพบสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค ทำให้เกิดการกระตุ้นผ่าน MHC class II ของ lymphocytes ผู้รับและนำไปสู่การสร้างแอนติบอดีในที่สุด[15,18,19]

ข้อสำคัญคือ แม้ว่าผู้ป่วยจะมี alloimmunization แต่มีเพียงประมาณร้อยละ 30-50 เท่านั้นที่จะพบว่ามีความสำคัญทางคลินิกหรือเป็นสาเหตุของภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด[9,19] ดังนั้นการประเมินภาวะ PTR ควรต้องดูจาก clinical refractoriness และการคำนวณระดับเกล็ดเลือดร่วมด้วยเสมอ

2. Human platelet antigen

HPA เป็นแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดที่มีความหลากหลายและสามารถกระตุ้นให้สร้าง alloantibody ได้หากได้รับเกล็ดเลือดที่มี HPA ต่างไป ปัจจุบันมีการค้นพบ HPA ทั้งหมด 33 แอนติเจนซึ่งแสดงออกอยู่บน 6 glycoproteins (GPs) ได้แก่ GPIIb, GPIIIa, GPIbα, GPIbβ, GPIa และ CD109 โดย 20 จาก 33 แอนติเจนพบอยู่บน GPIIb/GPIIIa คอมเพลกซ์ (Figure 1) สามารถค้นหารายชื่อของ HPA ได้จากฐานข้อมูล - IPD immuno polymorphism database (https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html)[20] หรือ International Society of Blood Transfusion (ISBT) https://www.versiti.org/hpa[21] ในจำนวนนี้ 12 ชนิดของแอนติเจนที่จำเพาะกับเกล็ดเลือดสามารถจัดกลุ่มเป็น 6 คู่ของอัลลีล (biallelic groups) คือ HPA-1 ถึง -5 และ HPA-15 โดยเรียกแอนติเจนที่พบบ่อยกว่าเป็น 'a' และที่พบน้อยเป็น 'b' เช่น HPA-1a พบได้บ่อยกว่า HPA-1b เป็นต้น ซึ่งจะมีความชุกแตกต่างกันไปตามเชื้อชาติ [22,23] สำหรับในประเทศไทย จากรายงาน genotype และ gene frequencies ของ HPA ในผู้บริจาคเลือด ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 500 รายโดย Kupatawintu P และคณะ[24] และผู้บริจาคเลือด 300 ราย จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดย Romphruk A และคณะ[25] พบความชุกไม่ต่างกันในประชากรต่างภูมิภาค

แอนติบอดีต่อ HPA นับว่าเป็นแอนติบอดีที่มีผลทางคลินิกได้หลากหลาย โดยพบเป็นสาเหตุของ (1) fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) (2) PTR และ (3) post-transfusion purpura (PTP) ในบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะความสำคัญของ HPA ต่อการเกิด PTR เท่านั้น พบว่าการสร้าง HPA แอนติบอดีมักเกิดคู่กับ HLA แอนติบอดี การสร้าง HPA แอนติบอดีเพียงชนิดเดียวพบได้น้อยกว่า 10%[9,26-28] ของผู้ป่วยที่มี PTR อย่างไรก็ดีวิธีการตรวจที่ต่างกันอาจทำให้มีความแตกต่างในแต่ละการศึกษาได้ เช่น TRAP trial รายงานว่าพบ HPA แอนติบอดี 8% จากผู้ป่วยทั้งหมด 530 ราย โดยใช้เทคนิค ELISA และ flow cytometry[9] ต่อมา Wang และคณะ

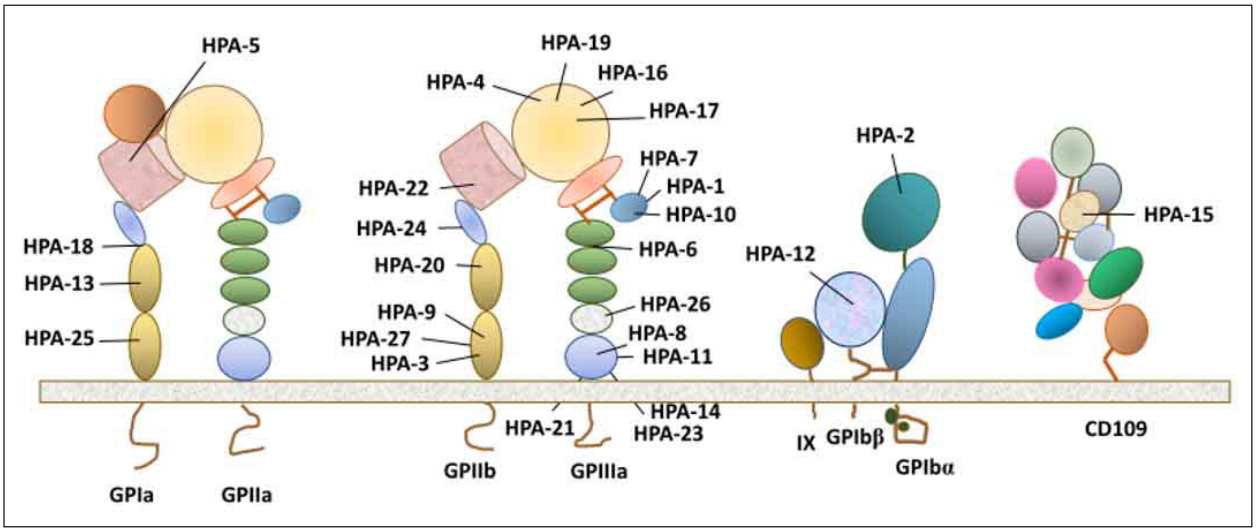

Figure 1 Human platelet antigens exhibit on platelet glycoproteins

HPA, human platelet glycoprotein; GP, glycoprotein

Modified from Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. Br J Haematol. 2013;161:3-14.

ซึ่งนำตัวอย่างที่ตรวจพบแอนติบอดีด้วยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทั้งหมด 45 ตัวอย่างมาตรวจยืนยันด้วย monoclonal immobilization of platelet antigen (MAIPA) พบว่าให้ผลบวกเพียงแค่ 4 ตัวอย่างเท่านั้น[27] สำหรับการศึกษาความชุกของ HPA แอนติบอดีในประชากรไทย พบการรายงาน 8 รายจากผู้ป่วย 324 รายที่พบมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดทั้งหมด (2.47%) และอีก 43 รายที่พบมีทั้งแอนติบอดีต่อ HLA ร่วมกับ HPA (13.27%) ในขณะที่แอนติบอดีต่อ HLA เพียงอย่างเดียวพบสูงถึง 273 ราย (84.26%)[28] การที่พบแอนติบอดีของ HLA ได้สูงในประชากรไทยเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจากการศึกษาอื่น อาจเกิดจากการได้รับเลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือดที่ไม่ใช่ leukodepletion นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแอนติบอดีต่อ HPA-1a สัมพันธ์กับ HLA class II คือ HLA-DRB3*01:01 และ HLA-DRB4*01:01[29]

3. Glycoprotein IV

GPIV หรือ CD36 เป็นแอนติเจนที่แสดงออกบนเกล็ดเลือด monocytes/macrophages บนเม็ดเลือดแดงที่ยังมีนิวเคลียส และ endothelial cells การแสดงออกของ CD36 ถูกควบคุมด้วยยีนชื่อเดียวกันซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 CD36 อยู่ใน scavenger receptor protein family ทำหน้าที่เป็น receptor ของ thrombospondin บนเกล็ดเลือด และ oxidized LDL ช่วยในการส่งผ่าน fatty acid ไปยัง plasma membrane[30] นอกจากนี้ CD36 ยังเป็น receptor ช่วยในการจับกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อ *plasmodium falciparum* และ endothelial cells ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกาะบนผนังหลอดเลือดและไม่ถูกทำลายที่ม้าม[31] ซึ่งอาจเป็นเหตุผลที่อธิบายการเกิดมิวเทชั่นของ CD36 จึงพบมากในชาวแอฟริกันและชาวเอเชีย[37] ในขณะที่แทบจะไม่พบ CD36 deficiency ในชาว Caucasians (0.1%) แต่ความชุกของ CD36 deficiency ในชาวเอเชียและแอฟริกาพบได้มากถึงร้อยละ 2-4 และ 4-8 ตามลำดับ[32,33]

การเกิด CD36 deficiency เกิดได้สองแบบ คือการไม่แสดงออกบน monocytes และเกล็ดเลือด (type I deficiency) หรือไม่แสดงออกเพียงบนเกล็ดเลือดเท่านั้น (type II deficiency)[34] ซึ่งเฉพาะ type I deficiency เท่านั้นที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของ platelet alloimmunization และทำให้เกิด FNAIT, PTP และ PTR[35] ในประชากรไทย CD36 deficiency พบเพียง 10 ตัวอย่างจากการศึกษาผู้บริจาคเลือด 588 (1.67%) รายและพบ type I deficiency หนึ่งรายจากหกรายที่ได้รับการตรวจการแสดงออกของ CD36 บน monocytes[36]

4. หมู่เลือดอื่นๆ

หมู่เลือดที่แสดงออกบนเกล็ดเลือดได้แก่ หมู่ I, P, H และ ABO แต่การเกิด PTR พบเพียงแอนติบอดีต่อแอนติเจน A, B และ H ซึ่งจะแสดงออกในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลบน GPIIb ร่วมกับ platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31)[37] มีเพียงประมาณร้อยละ 4-7 ของประชากรเท่านั้นที่มีการแสดงออกของแอนติเจน A และ B สูง (20 เท่าจากปกติ) บนเกล็ดเลือด[22]

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับ immune cause platelet refractoriness

เมื่อตรวจพบว่ามีภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด และสงสัยสาเหตุจากระบบภูมิคุ้มกันควรพิจารณาส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจคัดกรองหาแอนติบอดี เมื่อตรวจพบจึงควรจัดหาเกล็ดเลือดที่ผ่านการตรวจความเข้ากันได้ (crossmatched compatible) หรือเลือกเกล็ดเลือดที่แอนติเจนเหมือนผู้ป่วยเพื่อการให้เกล็ดเลือดเกิดประสิทธิภาพสูงสุด แผนภูมิแสดงแนวทางการ approach PTR การตรวจทางห้องปฏิบัติการและการจัดหาเกล็ดเลือด สรุปดัง Figure 2 ในขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถแบ่งออกได้เป็นการตรวจคัดกรองเพื่อหาแอนติบอดีทั้ง HLA HPA หรือ anti-Nak[a] และการตรวจแอนติเจนบนเกล็ดเลือดผู้ป่วย

1. Antibody screening assay

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาชนิดและประเมินความแรงของแอนติบอดีที่ผู้ป่วยสร้างต่อเกล็ดเลือดสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างกันไปดังนี้

1.1 Cell-based assay

การตรวจแอนติบอดีในกรณี immune cause PTR ใช้วิธี complement-dependent cytotoxicity (CDC) หรือ lymphocytotoxicity test (LCT) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA class I เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถบอกถึง HPA หรือ ABH แอนติบอดี CDC เป็นวิธีที่มีความไวต่ำแต่ค่อนข้างจำเพาะ เพราะจะตรวจพบเฉพาะ IgG subclass ที่สามารถ fix complement ได้ (IgG1 และ IgG3)[38] ทำได้โดยการนำ serum ผู้ป่วยมา incubate กับ panel ของ lymphocytes ที่เราทราบ HLA แอนติเจน จากนั้นใส่ complement ที่ได้จาก rabbit serum เมื่อเกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีจาก serum ของผู้ป่วยจะมีการกระตุ้นระบบ complement และสุดท้ายเกิด membrane attack complex ทำให้สี (dye) ซึมเข้าสู่เซลล์ที่ตายและเราสามารถอ่านปฏิกิริยาได้ผ่านกล้องจุลทรรศน์ จำนวนของเซลล์ที่ตายในแต่ละหลุมจะนำมาคิดเป็น score และการรายงานผลจะรายงานเป็นค่า

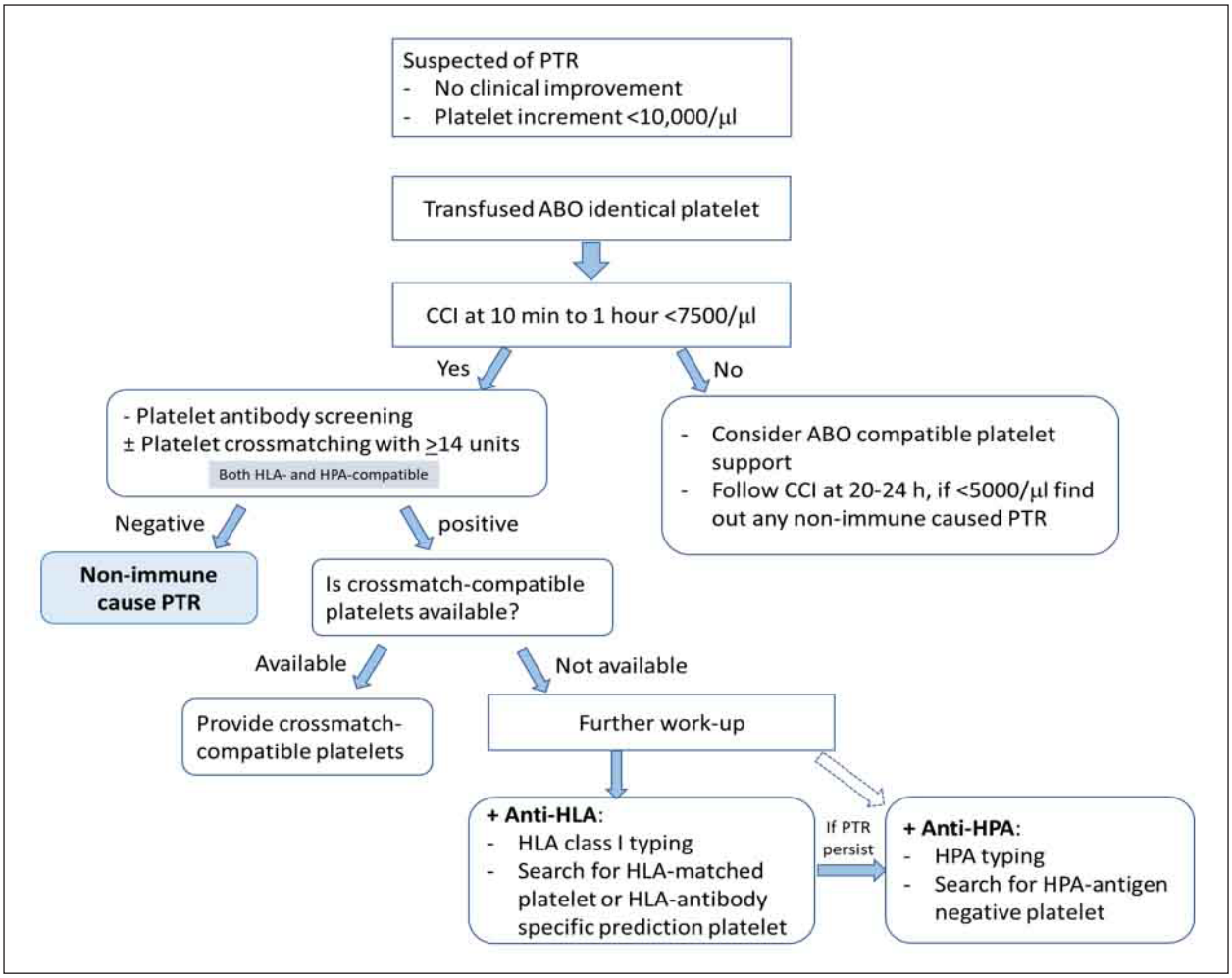

Figure 2 Suggested algorithm for management and work up of platelet refractoriness

panel reactive antigen (PRA) ตามจำนวนปฏิกิริยาที่ positive ต่อเกล็ดเลือดใน panel[38]

1.2 Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based methods

1.2.1 Measurement of platelet binding IgG

เป็นวิธีการตรวจโดยใช้เกล็ดเลือดที่ยังมีความสมบูรณ์มาทำปฏิกิริยากับ serum ผู้ป่วย และ control เช่นเทคนิค platelet immunofluorescence test (PIFT) ทำได้โดยนำ serum ที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีมา incubate กับเกล็ดเลือด หากมีแอนติบอดีใน serum ก็จะจับกับแอนติเจนบนเกล็ดเลือด จากนั้นจึงเติม anti-human IgG/IgM ที่ติดสลาก fluorescence เป็น secondary antibody เพื่อให้ไปจับกับแอนติบอดีที่จับบนผิวเกล็ดเลือด แล้วจึงอ่านผลการเรืองแสงได้สองแบบคือใช้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence หรืออาจอ่านผลด้วย flow cytometry ซึ่งจะให้ความแม่นยำที่สูงกว่าวิธีแรก[39]

Mixed passive hemagglutination test (MPHA) และ Solid-phase red cell adherence (SPRCA) มีหลักการคือการตรวจแอนติบอดีโดยใช้เกล็ดเลือดที่ยังสมบูรณ์ สามารถใช้เทคนิคนี้เพื่อการตรวจคัดกรองแอนติบอดีใน serum หรืออาจนำมาใช้เพื่อตรวจความเข้ากันได้ระหว่างเกล็ดเลือดผู้บริจาคและแอนติบอดีของผู้ป่วย การตรวจเพื่อการคัดกรองแอนติบอดีของเกล็ดเลือดทำได้โดยใช้ microwells plate ทั้งที่เป็น commercial kit หรือสามารถเตรียมเองได้[40] โดยนำ anti-thrombocyte มาเคลือบ microwell แล้วเติมเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคหมู่เลือดโอที่ทราบแอนติเจนของเกล็ดเลือด (platelet panel cells) incubate ล้างแอนติเจนส่วนเกินออก แล้วจึงหยด serum ที่ต้องการทดสอบลงไป ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา ล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนออก เติม indicator red cells (anti-human IgG coated RBCs) เพื่อใช้อ่านผลการแผ่กระจายของเซลล์เม็ดเลือดแดงในแต่ละหลุม (Figure 3) เราสามารถตรวจแยกแอนติบอดีของ HLA และ HPA ได้โดยใช้ chloroquine treated platelets ที่ทำลาย β2-microglobulin ของโมเลกุล HLA แอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือด แล้วจึงทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งเพื่อดูปฏิกิริยาจากแอนติบอดีของ HPA เท่านั้น[40] ต่อมามีการพัฒนาวิธี SPRCA ให้มีความจำเพาะกับ anti-HPA มากขึ้นโดยการใช้ platelet lysate และพัฒนาให้ anti-thrombocyte ไม่จับกับ HLA แอนติเจน[41]

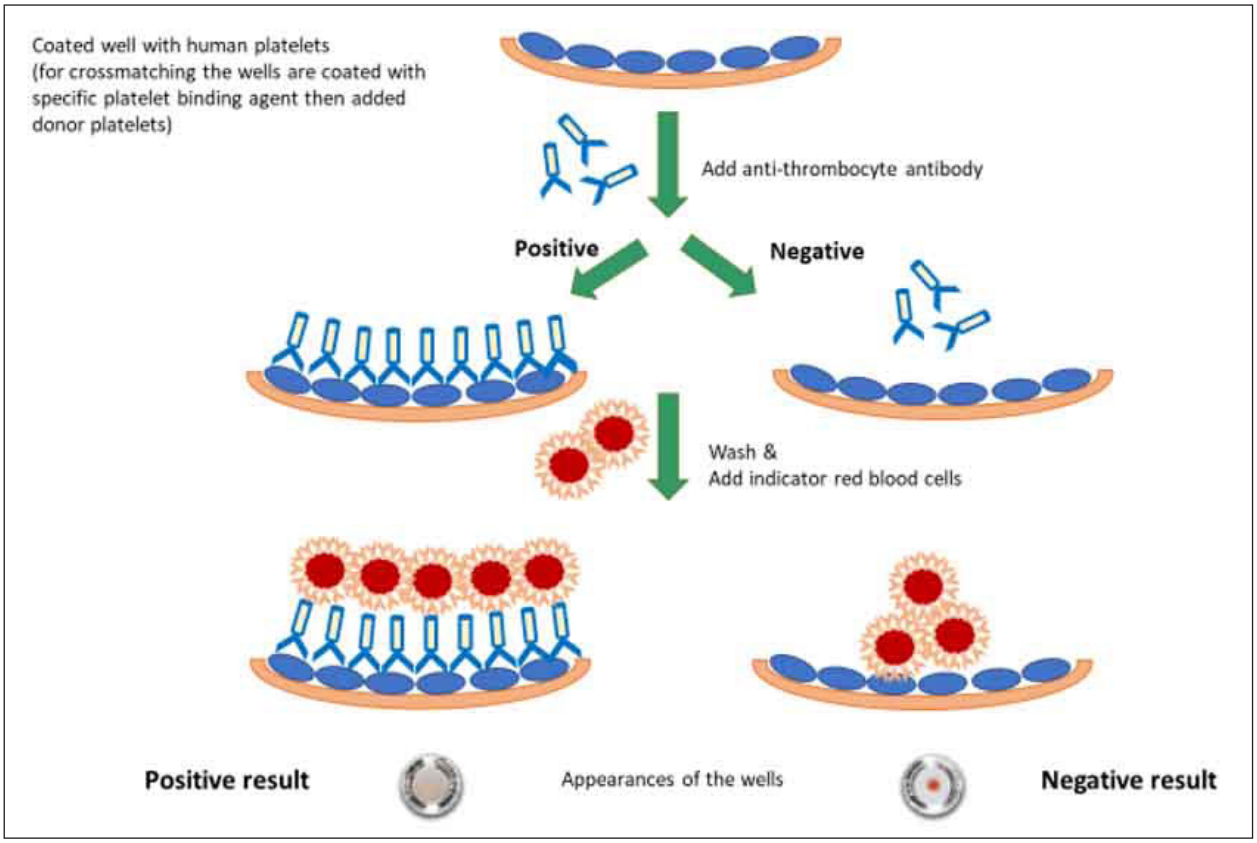

Figure 3 Diagram shows method of SPRCA test using whole platelets

การนำวิธี SPRCA มาใช้ตรวจความเข้ากันได้ (cross-matching) ทำได้โดยเติม platelet-rich plasma ของผู้บริจาคในแต่ละหลุมของ microwells ซึ่งมี anti-thrombocyte เคลือบอยู่เพื่อใช้ยึดเกล็ดเลือดกับผนังของ microwell ให้เป็นชั้นบางๆ แล้วจึงเติม serum ของผู้ป่วยลงไป ตรวจและอ่านผลเช่นเดียวกับวิธีตรวจคัดกรองแอนติบอดี เกล็ดเลือดที่ให้ผลการตรวจเป็นลบ (เห็นเม็ดเลือดแดงตกเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม) จึงจะแปลว่าเข้ากันได้กับเลือดผู้ป่วย

1.2.2 Target at platelet glycoproteins

เป็นการตรวจที่จำเพาะกับแอนติบอดีต่อ HPA เพราะใช้เฉพาะส่วน glycoprotein บนผิวเกล็ดเลือดแทนการใช้ whole platelet วิธีที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ modified antigen capture assay (MACE) และ monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA)

การตรวจวิธีแรก เกล็ดเลือดจะถูก incubate กับแอนติบอดี (anti-thrombocyte) จากนั้นจึงถูก solubilized ให้เหลือแต่ complex ระหว่าง GP และแอนติบอดี ซึ่งจะนำไปตรวจบน microwells ที่มี GP-specific monoclonal antibody (mAb) ในแต่ละหลุม การจับกันของ complex กับ mAb จะตรวจได้หลังจากเติม peroxidase-labeled AHG และ substrate แล้วจึงอ่านผลสุดท้าย[39]

สำหรับ MAIPA assay จะคล้ายกับ MACE แต่จะนำเกล็ดเลือดมา incubate กับทั้งแอนติบอดี และ mouse mAb ก่อนจะทำการ solubilize ให้ได้เฉพาะ complex ของ GP แล้วจึงนำมาใส่ใน plate ที่เคลือบด้วย goat anti-mouse IgG จากนั้นจึงเติม enzyme-labeled AHG และ substrate เพื่ออ่านผล[42] MAIPA นับเป็นวิธีตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูงและนับเป็น gold standard สำหรับการตรวจแอนติบอดีของเกล็ดเลือดในปัจจุบัน แต่ยังมีข้อจำกัดที่ระยะเวลาการตรวจค่อนข้างนาน ต่อมาจึงมีการปรับเปลี่ยนวิธีเพื่อลดเวลาตรวจลงแต่ยังคงใช้หลักการตรวจตามเดิม[43]

1.3 Beads based method

เทคโนโลยี Luminex (Luminex Co, Austin, TX, USA) ได้ถูกนำมาใช้สำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ซึ่งมีข้อดีคือมีความไวของการตรวจมาก สามารถตรวจครั้งละหลายตัวอย่างได้ในครั้งเดียว (high throughput) ทำให้ลดระยะเวลาและแรงงานในการตรวจลงได้มาก

Immune-complex capture fluorescence analysis (ICFA)[44] และ platelet antibody bead array (PABA)[45] เป็นวิธีคล้ายกับการตรวจ MAIPA และ MACE ดังกล่าวข้างต้นตามลำดับ แต่พัฒนาจากการตรวจบน microwell plate มาเป็น beads ที่จะถูกติดสลากด้วยสาร fluorescence (PE-conjugated goat

antihuman IgG antibodies) แทนการใช้ enzyme-labeled ก่อนนำไปอ่านผลด้วยเครื่อง Luminex ซึ่งจะบอกความแรงของแอนติบอดีด้วยค่า mean fluorescence intensity (MFI) แต่ละห้องปฏิบัติการจะมีการใช้ค่า cut-off ของ MFI เพื่อแปลผลว่าบวกหรือลบแตกต่างกันไป ทั้งวิธี ICFA และ PABA สามารถนำมาใช้ตรวจได้ทั้ง anti-HLA และ anti-HPA ขึ้นกับชนิดและความจำเพาะของแอนติเจนที่นำมาเคลือบบน beads[44] เช่น ใช้ pooled ของแอนติเจนจากหลายเซลล์สำหรับกรณีการตรวจคัดกรองแอนติบอดี ใช้แอนติเจนจากเซลล์เดียวในการตรวจ phenotype หรือการเคลือบแต่ละ bead ด้วยแอนติเจนเพียงชนิดเดียว สำหรับการตรวจ single-antigen bead (SAB) assay เป็นต้น นอกจากนี้มีการประยุกต์วิธีการตรวจเพื่อให้จำเพาะกับความสำคัญทางคลินิกของ HLA แอนติบอดี โดยการดูการกระตุ้นระบบ complement หรือ C1q assay โดยใช้ fluorochrome-labeled anti-C1q แทน AHG ซึ่งจะให้ผล positive เมื่อมีการกระตุ้น complement แล้วเท่านั้น[46]

2. Antigen typing

การตรวจการแสดงออกของแอนติเจนบนเกล็ดเลือดมีความสำคัญในการจัดหาเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนตรงกับผู้ป่วยเพื่อลดการเกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี (indirect alloimmunization) ที่อาจเกิดขึ้น โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ต้องได้รับเกล็ดเลือดเป็นระยะเวลานาน จึงควรได้รับการตรวจ antigen typing บนเกล็ดเลือดผู้ป่วย โดยการตรวจทำได้ทั้งในระดับซีโรโลยีและ genotyping ปัจจุบันการตรวจ genotype จาก DNA เป็นที่แพร่หลายกว่าเพราะสามารถตรวจได้ทั้ง HLA class I และ HPA แอนติเจนได้ มีความจำเพาะและความไวสูง แต่สำหรับในประเทศไทยยังคงมีการใช้การตรวจซีโรโลยีสำหรับ HLA แอนติเจนเพื่อการจัดหาเกล็ดเลือด

2.1 HLA class I typing ด้วยวิธีซีโรโลยี

การตรวจระดับซีโรโลยีทำได้โดยวิธี LCT โดยใช้การแยก whole lymphocytes หรือ T lymphocytes ที่ต้องการตรวจแล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ panel มาตรฐานของ serum ต่อ HLA-A และ -B แล้วตรวจด้วยวิธี LCT ดังที่บรรยายในหัวข้อ 1.1 อ่านผลโดยดูร้อยละของเซลล์ที่ตาย (ติดสีย้อม) และให้เป็น score ตามมาตรฐาน American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจด้วยวิธี LCT มีที่ใช้ลดลง เนื่องจากความยุ่งยากของการเตรียม panel มาตรฐานและใช้เวลานานในการตรวจ

2.2 HLA genotyping

เทคนิคสำหรับการตรวจการแสดงออกของแอนติเจน HLA class I สามารถตรวจได้โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence-specific primers (PCR-SSP), reverse sequence-specific oligonucleotide probes (SSO), หรือการตรวจด้วยวิธี sequencing นอกจากนี้ มีการนำเทคโนโลยี Luminex มาใช้สำหรับการตรวจเทคนิค reverse SSO โดยเคลือบ bead ด้วย oligonucleotide ต่างกันแทนการใช้การตรวจด้วยวิธี PCR แบบดั้งเดิมทำให้สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตัวอย่างในคราวเดียว

2.3 HPA typing

เนื่องจากการหาตัวอย่างเลือดที่มีแอนติบอดีต่อ HPA บางตำแหน่งทำได้ยาก ซึ่งนับเป็นข้อจำกัดที่สำคัญของการตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี ดังนั้นการตรวจ HPA typing ด้วย DNA จึงเป็นวิธี gold standard ในปัจจุบัน[22,47] วิธีที่นำมาใช้สำหรับตรวจมีหลายวิธี เช่น PCR-SSP, PCR-RFLP, 5'Nuclease, microarray, liquid bead array, mass spectrometry ทั้งที่เป็น in-house และ commercial available platform[47,48] รวมทั้งวิธีการตรวจใหม่ๆ เช่น next generation sequencing เป็นต้น[49] โดยในบทความฟื้นวิชานี้จะไม่ได้ลงรายละเอียดไปในแต่ละวิธี นอกจากสามารถตรวจได้โดยไม่ต้องใช้ panel ของแอนติบอดีต่อ HPA แล้วข้อดีของวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาคือ สามารถตรวจโดยใช้ตัวอย่างตรวจอื่นที่ไม่ใช่เลือด เช่น free DNA ของเด็กในเลือดมารดาในกรณีที่สงสัย anti-HPA ที่อาจทำให้เกิด FNAIT อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธีนี้ก็มีข้อจำกัด คือ การตรวจบางเทคนิคต้องรู้ชนิดของมิวเทชั่นก่อน หรือการให้ผล false negative จากการ hybridization ของ probe ที่ไม่สมบูรณ์ การมี silent alleles เป็นต้น[22]

การจัดหาเกล็ดเลือดสำหรับผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดที่มีสาเหตุจากการสร้างแอนติบอดี

การสืบค้นหาสาเหตุและการจัดการภาวะ PTR จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลด้านคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการควบคู่กันไป ดังแสดงใน Figure 2 สิ่งแรกที่ควรคำนึงถึงเมื่อเกิดภาวะไม่ตอบสนองต่อการได้รับเกล็ดเลือดคือหาสาเหตุด้าน non-immune และแก้ไข ถ้ายังพบภาวะ PTR อาจสงสัยสาเหตุที่มาจาก immune cause จึงส่งเพื่อคัดกรองแอนติบอดี[1] ควรขอเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้หากพบว่ามีแอนติบอดีแล้วเท่านั้น[50] มีวิธีการจัดหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้ดังนี้

1. Platelet crossmatching

เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้กับผู้ป่วยโดยไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลชนิดของแอนติบอดีหรือแอนติเจนของ HLA หรือ HPA การที่เกล็ดเลือดเข้ากันได้กับ serum ใน crossmatching หมายถึงแอนติบอดีไม่ว่าจะเป็น anti-HLA หรือ anti-HPA ของผู้ป่วยไม่มีผลต่อเกล็ดเลือดที่จะนำมาให้ เทคนิคที่ใช้สำหรับตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด

หรือการตรวจแอนติเจนของเกล็ดเลือดนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจความเข้ากันได้ระหว่างเกล็ดเลือดผู้บริจาคกับ serum ผู้ป่วย ได้แก่ LCT crossmatch, SPRCA, MACE และ flow cytometry crossmatch[51] สำหรับวิธีที่ใช้ที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราชคือ SPRCA ซึ่งทำได้ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาเพียง 45-60 นาทีต่อการตรวจและสามารถตรวจหลายตัวอย่างตรวจได้พร้อมกัน แต่เนื่องจากเกล็ดเลือดมีอายุที่สั้นเพียงห้าวันเท่านั้นจึงเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้คือควรต้องมีจำนวนเกล็ดเลือดที่มากพอเพื่อให้จัดหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันกับผู้ป่วยได้[38]

2. HLA-matched platelet

เนื่องจากสาเหตุส่วนใหญ่ของ immune PTR มาจากแอนติบอดีต่อ HLA ดังนั้นการจัดหาเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนของ HLA เข้าได้กับผู้ป่วยจึงเป็นวิธีที่ได้ผลการรักษาที่ดี โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระดับแอนติบอดีสูง[6,51] ข้อจำกัดสำคัญของวิธีนี้คือ ต้องรู้ผล HLA typing ของทั้งผู้ป่วยและผู้บริจาคเกล็ดเลือด เกณฑ์การคัดเลือก HLA-matched แสดงใน Table 2 อธิบายโดยสังเขปคือ A match เมื่อ HLA-A และ -B เหมือนกันทั้งสี่ตำแหน่ง; BU match คือผู้รับมี homozygosity ที่ HLA-A, B loci ทำให้มีหนึ่งตำแหน่งที่แตกต่างจากผู้บริจาค; BX match เมื่อมีหนึ่ง HLA-A หรือ -B ที่ไม่เข้ากันแต่ยังอยู่ใน Cross-reactive groups (CREGs); C match เมื่อต่างกันหนึ่งแอนติเจนที่ไม่ได้อยู่ใน CREGs; และ D match เมื่อมี > 1 non-CREGs ที่ต่างกัน[5,52] อธิบายเพิ่มเติมคือเนื่องจากแอนติบอดีต่อ HLA มักเกิดต่อ public epitopes ซึ่งคือการที่สองแอนติเจนขึ้นไปมี epitopes ที่เหมือนกัน (private epitopes จะพบบนแอนติเจนเดียวเท่านั้น) ทำให้ HLA แอนติบอดีจะมี cross-react ได้กับหลายอัลลีล เรียกว่า CREGs[53] การเลือก HLA-matched platelet มีหลักการคือยิ่งมีความเหมือนของ HLA ระหว่างผู้บริจาคและผู้รับจะยิ่งให้ผลของ increment ที่ดี โดยการให้เกล็ดเลือดที่มีความเหมือนในระดับ B2X, C, และ D ให้ผลไม่ต่างจากการให้ random donor platelets[38]

3. HLA-antibody specificity prediction (ASP) method

วิธีนี้ได้มีการแนะนำครั้งแรกโดย Petz และคณะ คือ การให้เกล็ดเลือดที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับชนิดที่ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดี โดยทำการเปรียบเทียบวิธี ASP กับอีกสองวิธีคือ HLA-matched และวิธี SPRCA crossmatching พบว่าวิธี ASP มีประสิทธิภาพในการเพิ่ม platelet count increment เทียบเท่ากับสองวิธีดังกล่าว แต่ง่ายกว่าในการจัดหาเกล็ดเลือดที่สามารถนำมาให้ผู้ป่วยได้[54] เป็นวิธีที่จะสามารถทำได้หลังจากทราบชนิดของ HLA แอนติบอดีของผู้ป่วยแล้วและเหมาะกับกรณีที่ต้องหาเกล็ดเลือดให้ผู้ป่วยที่มีระดับของ HLA แอนติบอดีสูงที่การหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้เป็นไปได้ยาก

เทคโนโลยีและวิธีการตรวจใหม่สำหรับ alloimmunization PTR

การพัฒนาวิธีการตรวจใหม่ๆ เพื่อช่วยแก้ปัญหา PTR เช่น การสร้าง cell lines ที่มีการแสดงออกของ HPA แอนติเจนที่ต้องการหรือหายากจาก Chinese hamster ovary, K562 หรือจาก induced-pluripotent stem cell (iPSC)[47,55] มาพัฒนาเป็น hematopoietic progenitor cells ที่มีการแสดงออกของ HPA ที่ต้องการ Zhang และคณะสามารถสร้าง HPA allele-specific megakaryocytes จาก iPSCs โดยไม่มีการแสดงออกของ HLA class I แอนติเจนโดยการใช้เทคโนโลยี CRISPR/Cas9 ซึ่งสามารถนำเกล็ดเลือดที่ได้มาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ anti-HPA-3A, -3b, และ -9b ได้ด้วยวิธี flow cytometry[55]

Table 2 HLA-matched platelet classification

Grade	Description	Examples				
		Recipient	A1	A3	B27	B8
A	HLA identical, all 4 antigens	Donor	A1	A3	B27	B8
BU	All antigens identical, only 3 antigens detected		A1		B27	B8
B2U	All antigens identical, only 2 antigens detected		A1		B8	
BX	3 antigens identical, fourth cross-reactive		A1	A24[a]	B27	B8
BUX	3 antigens; 2 identical and 3rd cross-reactive		A1	A24[a]	B8	
B2X	2 antigens identical, 2 cross-reactive		A1	A24[a]	B27	B64[a]
C	1 antigen mismatch, out-of-CREG		A1	A32[a]	B27	B8
D	All other ≥ 2 antigen mismatches		A1	A32[a]	B7[a]	B64[a]

a, mismatched antigens; CREG, cross-reactive group

Modified from Vassallo RR. New paradigms in the management of alloimmune refractoriness to platelet transfusions. Curr Opin Hematol. 2007;14:655-63.

ด้วยความรู้ที่ว่าการสร้างแอนติบอดีต่อ HLA ต่อ epitopes ซึ่ง epitope คือกลุ่มของ amino acids ที่แสดงออกบนผิวเกล็ดเลือด เท่านั้นดังนั้นจึงมีการพัฒนาการเลือกเกล็ดเลือดที่เข้ากับผู้ป่วยได้ตาม epitopes matching แทนการเลือก HLA-typed matching[56] ซึ่งมีการศึกษายืนยันว่าการเลือกโดยใช้หลักการนี้เทียบเคียงได้กับ HLA-matched ในระดับ A หรือ BU matching[57] โดยมีการจัดทำฐานข้อมูล http://www.hlamatchmaker.net สำหรับ epitope-matching โดยเฉพาะ[56]

สรุป

ภาวะการไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยทางคลินิกซึ่งมีผลที่ตามมาคือ เพิ่มความเสี่ยงของภาวะเลือดออกและอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงของผู้ป่วย แพทย์ผู้ดูแลควรนึกถึงภาวะนี้เมื่อผู้ป่วยยังมีเลือดออก หรือระดับเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นหรือแม้แต่ลดลงหลังจากได้รับเกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือดตรงกับผู้ป่วย ผู้ป่วยควรได้รับการประเมิน CCI ที่ 10-60 นาทีหลังได้เกล็ดเลือดเพื่อการวินิจฉัยภาวะนี้อย่างถูกต้อง การส่งเพื่อตรวจหาแอนติบอดีโดยไม่มีภาวะ PTR ไม่ก่อให้เกิดประโยชน์และยังทำให้การจัดหาเกล็ดเลือดต้องใช้เวลานานอาจส่งผลเสียต่อผู้ป่วยเนื่องจากเพียงร้อยละ 30-50 ของผู้ป่วยที่สร้างแอนติบอดีเท่านั้นที่พบว่ามีภาวะ PTR เมื่อวินิจฉัยได้ว่าผู้ป่วยมีภาวะ PTR จึงค่อยดำเนินการตามแนวทางปฏิบัติของโรงพยาบาลหรือศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยเพื่อจัดหาเกล็ดเลือดที่เข้ากับผู้ป่วยต่อไป นอกจากนี้การเลือกใช้เลือดกรอง (leukocyte-depleted blood) และให้เกล็ดเลือดเมื่อจำเป็นตามข้อบ่งชี้จะช่วยลดการเกิดภาวะ PTR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. *Murphy MF. Managing the platelet refractory patient. ISBT Science Series. 2014;9:234-8.*
2. *Toor AA, Choo SY, Little JA. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000;26:315-20.*
3. *Meehan KR, Matias CO, Rathore SS, Sandler SG, Kallich J, LaBrecque J, et al. Platelet transfusions: utilization and associated costs in a tertiary care hospital. Am J Hematol. 2000;64:251-6.*
4. *British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for the use of platelet transfusions. Br J Haematol. 2003;122:10-23.*
5. *Rebulla P. Formulae for the definition of refractoriness to platelet transfusion. Transfus Med. 1993;3:91-3.*
6. *Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness - practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. Br J Haematol. 2015;171:297-305.*
7. *Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. One-hour post-transfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations. JAMA. 1980;243:435-8.*
8. *Dunbar NM, Ornstein DL, Dumont LJ. ABO incompatible platelets: risks versus benefit. Curr Opin Hematol. 2012;19:475-9.*
9. *Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. N Eng J Med. 1997;337:1861-9.*
10. *Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, et al. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. Ann Hematol. 1997;74:185-9.*
11. *Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Rohatiner AZ, Lister TA, Waters AH. Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. Vox Sang. 1994;66:200-5.*
12. *Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. Blood. 2005;105:4106-14.*
13. *Lalezari P, Driscoll AM. Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma. Blood. 1982;59:167-70.*
14. *Datema G, Stein S, Eijsink C, Mulder A, Claas FH, Doxiadis II. HLA-C expression on platelets: studies with an HLA-Cw1-specific human monoclonal antibody. Vox Sang. 2000;79:108-11.*
15. *Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. Tissue Antigens. 2012;79:237-45.*
16. *Murphy MF, Metcalfe P, Ord J, Lister TA, Waters AH. Disappearance of HLA and platelet-specific antibodies in acute leukemia patients alloimmunized by multiple transfusion. Br J Haematol. 1987;67:255-60.*
17. *Atlas E, Freedman J, Blanchette V, Kazatchkine M, Semple JW. Downregulation of the anti-HLA alloimmune response by variable region-reactive (anti-idiotypic) antibodies in leukemic patients transfused with platelet concentrates. Blood. 1993;81:538-42.*
18. *Bang KWA, Speck ER, Blanchette VS, Freedman J, Semple JW. Unique processing pathways within recipient antigen presenting cells determine IgG immune responsiveness against donor platelet MHC antigens. Blood. 2000;95:1735-42.*
19. *Jackman RP, Lee JH, Pei R, Bolgiano D, Lebedeva M, Slichter SJ, et al. C1q-binding anti-HLA antibodies do not predict platelet transfusion failure in Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets study participants. Transfusion. 2016;56:1442-50.*
20. *EMBL-EBI. Immuno polymorphism database- alloantigen/protein data. [accessed 2020 May 14]. Available from: https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html.*

21. International Platelet Immunology Nomenclature Committee. [accessed 2020 May 14]. Available from: https://www.versiti.org/hpa
22. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106:93-102.
23. Tsuno NH, Matsuhashi JL, Nagura Y, Okazaki H, Santoso S. The importance of platelet antigens and antibodies in immune-mediated thrombocytopenia. ISBT Science Series. 2014;9:104-11.
24. 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.
25. Romphruk AV, Akahat J, Srivanichrak P, Puapairoj C, Romphruk A, Leelayuwat C. Genotyping of human platelet antigens in ethnic Northeastern Thais by the polymerase chain reaction-sequence specific primer technique. J Med Assoc Thai. 2000;83:1333-9.
26. Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients. Immunohematology. 2009;25:119-24.
27. Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. Transfus Med. 2018;28:40-6.
28. Srisuddee A, Kupatawintu P, Roekchai C, Inorn K, Phiancharoen S, Nathalang O, et al. A study of platelet antibody detection in patients at the National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med. 2016;26:183-9.
29. Loewenthal R, Rosenberg N, Kalt R, Dardik R, Landau M, Yahalom V, et al. Compound heterozygosity of HLA-DRB3*01:01 and HLA-DRB4*01:01 as a potential predictor of fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion. 2013;53:344-52.
30. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. J Clin Invest. 2001;108:785-91.
31. Hsieh FL, Turner L, Bolla JR, Robinson CV, Lavstsen T, Higgins MK. The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. Nat Commun. 2016;7:12837.
32. Curtis BR, Aster RH. Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African American is similar to that of Asians. Transfusion. 1996;36:331-4.
33. Xu X, Liu Y, Hong X, Chen S, Ma K, Lan X, et al. Variants of CD36 gene and their association with CD36 protein expression in platelets. Blood Transfus. 2014;12:557-64.
34. Yanai H, Chiba H, Fujiwara H, Morimoto M, Abe K, Yoshida S, et al. Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. Thromb Haemost. 2000;84:436-41.
35. Fujino H, Ohta K, Taniue J, Nagano N, Hino M, Yamane T, et al. Primary refractoriness to platelet transfusion caused by Nak(a) antibody alone. Vox Sang. 2001;81:42-4.
36. Kengkate M, Srisuddee A, Roekchai C, Chinbordee K, Phiancharoen S, Kupatawintu P, et al. The study of CD36 (Nak^{a} antigen) phenotype in platelet apheresis donors of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med. 2017;27:111-6.
37. Curtis BR, Edwards JT, Hessner MJ, Klein JP, Aster RH. Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals. Blood. 2000;96:1574–81.
38. Schmidt AE, Refaai MA, Coppage M. HLA-mediated platelet refractoriness. Am J Clin Pathol. 2019;151:353-63.
39. Matsuhashi M, Tsuno NH. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. Ann Blood. 2018;3:41
40. Kuptawintu P, Jitjak N, Saelee S, O-Charoen R, Nathalang O. The incidence of platelet antibody in thrombocytopenic patients. J Hematol Transfus Med. 2000;10:123-7.
41. Vongchan P, Nawarawong W, Linhardt RJ. Modification of solid phase red cell adherence assay for the detection of platelet antibodies in patients with thrombocytopenia. Am J Clin Pathol. 2008;130:455-66.
42. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody - specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood. 1987;70:1722-6.
43. Campbell K, Rishi K, Howkins G, Gilby D, Mushens R, Ghevaert C, et al. A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. Vox Sang. 2007;93:289-97.
44. Fujiwara K, Shimano K, Tanaka H, Sekine M. Kashiwase K, Uchikawa M, et al. Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. Vox Sang. 2009;96:244-51.
45. Metzner K, Bauer J, Ponzi H, Ujcich A, Curtis BR. Detection and identification of platelet antibodies using a sensitive multiplex assay system-platelet antibody bead array. Transfusion. 2017;57:1724-33.
46. Smith JD, Hamour IM, Banner NR, Rose ML. C4d fixing luminex binding antibodies-a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. Am J Transplant. 2007;7:2809-15.
47. 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.
48. Curtis BR. Genotyping for human platelet alloantigen polymorphisms: applications in the diagnosis of alloimmune platelet disorders. Semin Thromb Hemost. 2008;34:539-48.
49. Davey S, Navarrete C, Brown C. Simultaneous human platelet antigen genotyping and detection of novel single nucleotide polymorphisms by targeted next-generation sequencing. Transfusion. 2017;57:1497-1504.

50. *Estcourt LJ, Birchall J, Allard S, Bassey SJ, Hersey P, Kerr JP, et al. Guidelines for the use of platelet transfusions a British Society for Haematology Guideline. Br J Haematol. 2017;176:365-94.*
51. *Kopko PM, Warner P, Kresie L, Pancoska C. Methods for the selection of platelet products for alloimmune-refractory patients. Transfusion. 2015;55:235-44.*
52. *Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. Br J Hematol. 2008;142:348-60.*
53. *Vassallo RR. New paradigms in the management of alloimmune refractoriness to platelet transfusions. Curr Opin Hematol. 2007;14:655-63.*
54. *Petz LD, Garratty G, Calhoun L, Clark B, Terasaki PI, Gresens C, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. Transfusion. 2000;40:1446-56.*
55. *Zhang N, Santoso S, Aster RH, Curtis BR, Newman PJ. Bio-engineered iPSC-derived megakaryocytes for the detection of platelet-specific patient alloantibodies. Blood. 2019;134:e1-e8.*
56. *Duquesnoy RJ. Antibody-reactive epitope determination with HLAMatchmaker and its clinical applications. Tissue Antigens. 2011;77:525-34.*
57. *Pai S, Lo S, Tsai SL, Epitope-based matching for HLA-alloimmunized platelet refractoriness in patients with hematologic diseases. Transfusion. 2010;50:2318-27.*