บทความฟื้นวิชา

การตรวจความเข้ากันได้เพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะ

นิภาพรรณ ลี้ตระกูล
งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เทคโนโลยีด้านการปลูกถ่ายอวัยวะได้เจริญก้าวหน้ามาเป็นลำดับ ในปัจจุบันสามารถปลูกถ่ายอวัยวะได้หลายชนิด เช่น การปลูกถ่ายไต ตับ หัวใจ ปอด ตับอ่อน เป็นต้น แต่ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานร่วมกับมีภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายอาจจะมีการปลูกถ่ายทั้งไตและตับอ่อนให้ผู้ป่วยในขณะเดียวกัน[1] นอกจากนี้ยังสามารถปลูกถ่ายใบหน้าสำหรับผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุบนใบหน้าหรือปลูกถ่ายมือในผู้ที่ได้รับอุบัติเหตุจนมือขาดได้[2] แต่อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายอวัยวะจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยไม่ว่าจะโดยพื้นฐานของโรคและสุขภาวะที่ผู้ป่วยเป็นอยู่ เทคนิคในการผ่าตัดที่ได้รับการพัฒนา การได้รับยากดภูมิต้านทานต่ออวัยวะที่ใส่เข้าไป การมีหมู่เลือด ABO/Rh ที่เข้ากันได้กับผู้ป่วย และที่สำคัญคือการมีแอนติเจน Human leukocyte antigen (HLA) ที่เข้ากันกับผู้ป่วย[3] ดังนั้นการปลูกถ่ายอวัยวะในระยะเริ่มแรกผู้ป่วยส่วนใหญ่จะได้รับอวัยวะบริจาคจากบุคคลในครอบครัวเดียวกัน เช่น พ่อ แม่ พี่ น้อง เป็นต้น เพราะโอกาสที่จะพบแอนติเจน HLA ที่เหมือนกันกับผู้ป่วยมีมากกว่าผู้ที่ไม่ใช่ญาติใกล้ชิด จากคุณสมบัติของแอนติเจน HLA ที่จะถ่ายทอดพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่นเป็นชุด แต่เนื่องด้วยในปัจจุบันครอบครัวมีขนาดเล็กลง ผู้ป่วยอาจจะเป็นลูกคนเดียวจึงเกิดภาวะการขาดแคลนอวัยวะบริจาค ดังนั้นในหลายประเทศจึงมีการรณรงค์ให้มีการบริจาคอวัยวะจากผู้ที่ไม่ใช่ญาติ เช่น ในกรณีที่ผู้บริจาคเกิดภาวะสมองตายแต่อวัยวะภายในยังทำงานได้ดี ทั้งนี้ เพื่อให้มีอวัยวะสำหรับการปลูกถ่ายแก่ผู้ป่วยที่มีการทำงานของอวัยวะล้มเหลวหรือได้รับอุบัติเหตุ[4]

ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะจะต้องมีการตรวจหาแอนติเจน HLA หรืออัลลีล HLA ทั้งของผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะเพื่อหาชนิดของแอนติเจน HLA ที่เหมือนหรือเข้ากันได้กับผู้ป่วยเพื่อป้องกันการเกิด graft rejection[5] แต่หลังจากที่ Patel และ Terasaki[6] พบสาเหตุที่ทำให้เกิด hyperacute rejection ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต จากการที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อ HLA ในร่างกาย ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ผู้ป่วยเคยรับเลือดของผู้อื่น เคยตั้งครรภ์หรือเคยได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะมาแล้ว จึงมีการตรวจความเข้ากันได้ (HLA crossmatching) ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยและ lymphocyte ของผู้บริจาคอวัยวะ ในปัจจุบันมีการตรวจกรองหา panel reactive antibody (PRA) เพื่อหาร้อยละของการตรวจพบแอนติบอดีต่อ HLA และหาความจำเพาะของแอนติบอดีในระดับที่จำเพาะกับแอนติเจน HLA ของผู้บริจาคอวัยวะ (donor specific antibody, DSA) ซึ่งมีเทคนิคการตรวจหลายวิธี แต่ละวิธีจะมีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกันไป การสื่อสารทำความเข้าใจกันระหว่างห้องปฏิบัติการกับแพทย์จะช่วยให้มีความเข้าใจที่ตรงกันและเกิดประโยชน์สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ

การตรวจ HLA typing

เซลล์ที่มีนิวเคลียสเกือบทุกชนิดทั่วร่างกายจะพบโมเลกุล HLA class I (HLA-A, -B, -C) อยู่บนผิวเซลล์ซึ่งมีหน้าที่นำเสนอเป็ปไทด์ของสิ่งแปลกปลอมให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผ่าน CD8+ T lymphocytes ในขณะที่โมเลกุล HLA class II (HLA-DR, -DQ, -DP) จะพบบนเซลล์บางชนิด เช่น B cells, antigen-presenting cells และ activated microvascular endothelial cells และนำเสนอเป็ปไทด์ผ่าน CD4+ T lymphocytes[7,8] ดังนั้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ จึงขึ้นอยู่กับความเหมือนหรือความแตกต่างของแอนติเจน HLA ระหว่างผู้ป่วยและผู้ที่บริจาคอวัยวะให้ผู้ป่วย ห้องปฏิบัติการ HLA จะใช้เทคนิคทางด้านซีโรโลยีและเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาโดยวิธีเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction, PCR) ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA ซึ่งแม้ว่าจะใช้วิธีอณูชีววิทยาแล้วผลการตรวจที่ได้จะยังคงมีความละเอียดแตกต่างกันตั้งแต่ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นำมาใช้ในการตรวจ ซึ่งจะมีจำนวน primers หรือจำนวน probes แตกต่างกันไปในแต่ละชุดของน้ำยา ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการ HLA จะต้องประเมินคุณภาพของน้ำยาก่อนที่จะนำมาใช้ในการตรวจ เพื่อให้ผลการตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่เชื่อถือ

การตรวจ HLA typing โดยวิธีซีโรโลยี

จากการที่ Jean Dausset[9] พบการเกิดปฏิกิริยา leukoagglutination ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยที่เคยรับเลือดมาหลายครั้งกับเม็ดเลือดขาวของผู้อื่น โดยที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดขาวของตนเอง

จนเป็นที่มาของการพบว่าแอนติเจน HLA เป็น major human histocompatibility complex แต่วิธีนี้ยังมีความไวและความจำเพาะไม่พอ และมีความสิ้นเปลืองทรัพยากรโดยเฉพาะแอนติบอดีที่นำมาใช้ทดสอบ จนกระทั่ง Paul Terasaki[10] พบวิธีที่จะใช้แอนติซีรัมจำนวนเพียง 1 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกิริยาการทดสอบโดยใช้หลักการ complement dependent cytotoxicity (CDC) หรือเรียกว่าวิธี microlymphocytotoxicity test (LCT) ซึ่งไม่เพียงแต่จะทำให้การตรวจ HLA typing มีมาตรฐานขึ้นมาเท่านั้น วิธีนี้ยังทำให้เกิดการค้นพบ HLA แอนติเจนชนิดใหม่ๆ เพิ่มขึ้นจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยนักวิทยาศาสตร์จากหลายประเทศทั่วโลกซึ่งมีการแลกเปลี่ยนแอนติซีรัมกันระหว่างห้องปฏิบัติการ และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกันจนมีความเข้าใจบทบาทและหน้าที่ของแอนติเจน HLA และนำไปสู่การค้นพบความสำคัญของแอนติเจน HLA ว่ามีความเกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกถ่ายไตที่ปลูกถ่ายกันมากกว่าอวัยวะอื่น วิธี CDC ยังเป็นวิธีมาตรฐานที่ไม่เพียงจะใช้หาแอนติเจน HLA แต่ยังใช้ทดสอบหาความเข้ากันได้ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยและแอนติเจน HLA ของผู้บริจาคอวัยวะก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะ เพื่อความปลอดภัยของผู้ป่วย นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจกรองและหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HLA ในผู้ป่วยทั้งก่อนและหลังการปลูกถ่ายอวัยวะด้วย

ในปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายจึงทำให้มีความสะดวกในการตรวจ HLA typing ด้วยวิธีซีโรโลยีโดยใช้ lymphocyte ที่แยกจากเลือดครบส่วนในกรณีผู้ป่วยทั่วไปและผู้บริจาคอวัยวะที่มีชีวิต แต่กรณีผู้บริจาคสมองตายที่นำอวัยวะออกมาจากร่างกายของผู้บริจาคแล้วจะใช้ lymphocyte ที่เตรียมจากต่อมน้ำเหลืองหรือจากม้าม นำ lymphocyte ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ HLA ที่มีในถาดหลุมที่ใช้ทดสอบ หลังจากนั้นเติมคอมพลีเมนท์ที่เตรียมจากซีรัมของกระต่ายลงไป และเติมสีลงไปในขั้นตอนสุดท้าย เซลล์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ HLA ผนังเซลล์จะเกิดรูรั่วทำให้เซลล์ตาย สีจึงเข้าไปในเซลล์ได้และติดสีทึบเมื่อนำไปอ่านด้วยกล้อง inverted phase contrast microscope ส่วนเซลล์ที่ไม่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีต่อ HLA เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่และสามารถขจัดสีออกมาได้จึงไม่ติดสี มีลักษณะมันวาวสะท้อนแสง อ่านผลที่ได้ลงในแบบฟอร์มแล้วนำไปแปลผล วิธีนี้สามารถตรวจได้รวดเร็ว แต่สามารถตรวจได้เฉพาะแอนติเจน HLA ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์เท่านั้นและที่สำคัญจะต้องใช้เซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 มาทดสอบ คอมพลีเมนท์ที่นำมาใช้ต้องมีการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิด cytotoxic ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม แอนติบอดีต่อ HLA ที่นำมาใช้ทดสอบจะต้องมีความแรงและความจำเพาะสูง แต่อย่างไรก็ตามวิธีซีโรโลยีไม่สามารถทดสอบหา null allele หรือแอนติเจน HLA ที่มีความแตกต่างของกรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่งได้ เช่น *HLA-B*44:02* และ *HLA-B*44:03* ซึ่งมีความแตกต่างกันที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 156[11] ถ้าตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีสามารถบอกได้เพียง HLA-B44 เท่านั้น ร่างกายของผู้ที่รับอวัยวะอาจจะสร้างแอนติบอดีต่อ epitope ที่ต่างกันนี้ ดังนั้นจึงควรตรวจ HLA typing เพิ่มเติมโดยวิธีอณูชีววิทยาเพื่อรายงานผล HLA ในระดับอัลลีล

การตรวจ HLA typing โดยวิธีอณูชีววิทยา

การสร้างแอนติเจน HLA ชนิดต่างๆ ขึ้นกับยีนที่ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6[11] ซึ่งมีการตรวจทางอณูชีววิทยาหลายวิธี ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 3 วิธี คือ PCR-sequence specific primer (PCR-SSP), PCR-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSOP) และวิธี sequence based typing (SBT) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการผลการตรวจที่มีความละเอียดในระดับใด เพราะบางสถาบันสามารถทำได้เฉพาะการปลูกถ่ายอวัยวะ แต่ยังไม่สามารถดำเนินการปลูกถ่ายไขกระดูกได้ จึงไม่จำเป็นต้องใช้วิธี SBT ส่วนจะเลือกวิธี PCR-SSP หรือ PCR-SSOP ขึ้นอยู่กับความสะดวกหรือความเหมาะสม หรือจะเลือกทั้ง 2 วิธีเพื่อใช้ในการตรวจยืนยันผล เพราะการตรวจหาอัลลีล HLA อาจจะสรุปผลไม่ได้โดยวิธีใดวิธีหนึ่ง วิธี PCR-SSP เหมาะสมกับตัวอย่างจำนวนน้อยแต่ต้องใช้ปริมาณ DNA มาก มีขั้นตอนในการทำไม่ยุ่งยาก ให้ผลรวดเร็วและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง[12] ในขั้นตอนการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมจะใช้ DNA คู่สม (primer) จำนวนหลายคู่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความละเอียดของผลที่ต้องการ ถ้าต้องการความละเอียดสูงก็ใช้ primer จำนวนมาก ในทำนองเดียวกันวิธี PCR-SSOP ความละเอียดของผลที่ต้องการขึ้นอยู่กับจำนวน probe ที่นำมาใช้ แต่วิธี PCR-SSOP จะใช้เวลามากกว่าวิธี PCR-SSP เพราะมีขั้นตอนมากกว่า แต่มีข้อดีคือใช้ปริมาณ DNA น้อยกว่าวิธี PCR-SSP สามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก และมีเครื่องอัตโนมัติเข้ามาช่วยให้การทำงานสะดวกขึ้น อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีจะต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการวิเคราะห์ผลและแปลผล จึงต้องมีการปรับปรุงฐานข้อมูล HLA อัลลีลในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ให้ทันสมัยอยู่เสมอ[13] ส่วนวิธี SBT เป็นวิธีที่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงมาก แต่มีข้อดีคือ สามารถให้ผลที่มีความละเอียดสูง เพราะเป็นการดูลำดับของนิวคลิโอไทด์ในตำแหน่งของยีนที่สนใจเทียบกับยีน HLA ที่รายงานไว้แล้ว[11] การตรวจยีน HLA โดยวิธีอณูชีววิทยาช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างของ HLA ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะได้ตั้งแต่ระดับแอนติเจน ระดับ

กรดอะมิโน จนกระทั่งถึงระดับ epitopes แต่อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปการตรวจ HLA typing สำหรับการปลูกถ่ายอวัยวะในหลายประเทศหรือแม้แต่ในประเทศสหรัฐอเมริกา จะตรวจแอนติเจน HLA-A, -B และ -DR เป็นอย่างน้อย ตามข้อกำหนดขององค์กร Organ Procurement and Transplant Network (OPTN)[14] แต่มีบางห้องปฏิบัติการที่ตรวจหา HLA-C, -DQ และ -DP เพิ่มเติม เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการ HLA ในประเทศไทยที่บางสถาบันอาจจะตรวจไม่ครบทั้ง 6 ตำแหน่ง แต่อย่างน้อยจะต้องตรวจหา HLA-A, -B และ -DR เพราะเป็นตำแหน่งสำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกผู้รับอวัยวะ การผ่าตัดปลูกถ่ายหัวใจ ปอด และตับ ไม่ได้นำแอนติเจน HLA มาใช้ในการตัดสินใจเลือกอวัยวะจากผู้บริจาคสมองตาย ด้วยเหตุผลในเรื่องของเวลาที่ต้องรีบนำอวัยวะไปปลูกถ่ายภายใน 4-6 ชั่วโมง ไม่สามารถรอผลการตรวจได้ แตกต่างกับการปลูกถ่ายไตที่สามารถรอได้นานประมาณ 24-30 ชั่วโมง จึงต้องใช้แอนติเจน HLA ในการคัดเลือกหาผู้รับไตเพราะถ้าแอนจิเจน HLA ของผู้ป่วยมีความเหมือนกับผู้บริจาคไตมากที่สุดทั้ง 3 ตำแหน่ง จะส่งผลถึงความอยู่รอดของไตที่ผู้ป่วยได้รับ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการพัฒนายากดภูมิคุ้มกันขึ้นมาหลายชนิดแล้วก็ตาม[15] นอกจากนี้ระดับความแตกต่างของแอนติเจน HLA ระหว่างผู้รับและผู้ให้อวัยวะจะมีผลโดยตรงทั้งต่อการสร้างแอนติบอดีต่อ HLA และความแรงของแอนติบอดีที่ผู้ป่วยสร้างขึ้น[16] มีผลกระทบต่อการรอคอยอวัยวะบริจาคนานขึ้นโดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอายุน้อยและรอปลูกถ่ายไตครั้งที่สอง จึงทำให้คุณภาพชีวิตลดลง[17] ดังนั้นความถูกต้องของผลการตรวจ HLA typing ทั้งของผู้ให้และผู้รับอวัยวะจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อนำมาใช้ในการทำนายการตรวจความเข้ากันได้ของอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ร่างกายถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ HLA

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA

การที่ร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าไป เช่น การรับเลือด การตั้งครรภ์ และการเคยได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ทำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีขึ้น แต่ในผู้ป่วยชายบางรายที่ไม่เคยได้รับเลือดหรือเคยปลูกถ่ายอวัยวะมาก่อนก็สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ HLA ได้ อาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสที่ผู้ป่วยเคยสัมผัสมีส่วนที่คล้ายกับโมเลกุล HLA[18] ผู้ป่วยเหล่านี้จึงมีโอกาสได้รับอวัยวะบริจาคน้อยลง ในผู้ป่วยที่มาขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจึงต้องมีการตรวจกรองหาความจำเพาะและความแรงของแอนติบอดีต่อ HLA อยู่เป็นระยะๆ นอกจากนี้ยังต้องตรวจหา isotype ของแอนติบอดีด้วย เพราะถ้าเป็นแอนติบอดีชนิด IgG จะมีผลต่อการเกิดการปฏิเสธกราฟท์โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีความแรงของแอนติบอดีต่อ HLA ในระดับสูงมากและเป็นสาเหตุทำให้เกิด hyperacute rejection[19] ดังนั้นวิธีการตรวจที่มีทั้งความไวและความจำเพาะจึงเป็นสิ่งที่ต้องนำมาพิจารณา

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA โดยวิธี cytotoxic

โดยทั่วไปจะใช้เซลล์ lymphocyte ของผู้อื่นประมาณ 20-40 รายที่มี HLA แอนติเจนแตกต่างกันมาทดสอบกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยโดยใช้วิธีซีโรโลยีคือวิธี microlymphocytotoxicity และนำจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาค่า panel reactive antibody (PRA) เช่น ถ้าใช้เซลล์ทั้งหมดจำนวน 40 รายและให้ผลบวกจำนวน 30 ราย ค่า PRA ที่ได้คือร้อยละ 75 แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือร้อยละของ PRA จะเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับแอนติเจน HLA ของเซลล์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งมีความถี่ที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ วิธีนี้อาจจะเกิดผลบวกปลอมในกรณีที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อเซลล์ของตนเองหรือมีแอนติบอดีชนิด IgM ที่ไม่จำเพาะ หรือมีแอนติบอดีต่อ non-HLA และอาจจะเกิดผลลบปลอมจากการที่มีความแรงของแอนติบอดีในระดับต่ำ หรือใช้คอมพลีเมนท์ที่ไม่มีคุณภาพ ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HLA อาจจะบอกไม่ได้ในกรณีที่ให้ผลบวกกับแอนติเจน HLA ที่เป็น cross-reactive group (CREG)[20] ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมด ทำให้ห้องปฏิบัติการ HLA เปลี่ยนวิธีการตรวจหาแอนติบอดีเป็นวิธี solid phase assays ซึ่งมีความไวและความจำเพาะที่ดีกว่าวิธี CDC แต่อย่างไรก็ตามวิธี CDC ยังคงใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจความเข้ากันได้ระหว่างผู้ให้และผู้รับอวัยวะ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA โดยวิธี solid phase assays

Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีเริ่มแรกที่ใช้ตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อ HLA ด้วยวิธี solid phase assays โดยการนำโมเลกุล HLA ที่เตรียมจากเกล็ดเลือดซึ่งมีแอนติเจน HLA class I ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA class II จะใช้ lymphoblastoid cell lines (LCL) จากผู้บริจาคหลายคนมารวมกัน และนำมาเคลือบลงไปในหลุมของ ELISA plate เติมซีรัมของผู้ป่วยใส่ลงไป หลังจากนั้นเติม enzyme-conjugated anti-human immunoglobulin แล้วนำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของสีที่เกิดขึ้น วิธีนี้จะมีความไวกว่าวิธี CDC แต่มักจะเกิดผลบวกปลอมขึ้นได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เป็นโรค autoimmune หรือมีแอนติบอดีต่อ cardiolipin[21,22] ส่วนใหญ่จะถูกออกแบบให้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG แต่ก็สามารถหา isotypes อื่นได้ วิธีนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยม จึงถูกแทนที่ด้วยวิธี flow cytometry มากว่า 20 ปีแล้ว

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA โดยวิธี flow cytometry

โดยการนำแอนติเจน HLA class I หรือ HLA class II ที่เตรียมจากเซลล์ LCL ของแต่ละคนมาเคลือบบนเม็ด beads ในกรณีที่ต้องการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีต่อ HLA class I หรือ HLA class II แต่ถ้าต้องการตรวจกรองเพื่อหาแอนติบอดีต่อ HLA จะนำเม็ด beads ของ HLA ทั้งสองชุดมารวมกัน โดยใช้หลักการเดียวกับวิธี ELISA เพียงแต่ในขั้นตอนการวัดผลของสาร fluorescence จะใช้เครื่อง flow cytometer เทียบกับผลของ negative control ซึ่งจะรายงานผลออกมาในรูป histogram วิธีนี้จึงเป็น semi-quantitative ที่สามารถคำนวณหาค่า PRA และหาความจำเพาะของแอนติบอดีได้ เพราะแอนติเจน HLA ที่นำมาเคลือบบนเม็ด beads มาจากแต่ละคน วิธีนี้ถูกออกแบบมาให้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG และในกรณีที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีในระดับต่ำ เม็ด beads ที่นำมาใช้อาจจะมีแอนติเจน HLA ไม่ครอบคลุมในประชากรกลุ่มนั้น จึงต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญมาช่วยในการยืนยันผล[23,24] แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธี ELISA ประมาณร้อยละ 10[25]

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA ด้วยวิธี Luminex™ fluoroanalyzer

เป็น solid-phase immunoassays ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ HLA ชนิด IgG กันอย่างแพร่หลาย[26] แม้ว่าจะมีความไวในการตรวจสูงมาก แต่อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำยาสำเร็จรูปที่นำมาใช้ในการทดสอบ[27] เพราะน้ำยาจะแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับหนึ่ง คือ LABScreen Mixed สำหรับตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อ HLA ทั้ง HLA class I และ HLA class II ซึ่งแต่ละเม็ด bead จะเคลือบด้วยแอนติเจน HLA class I หรือ class II จากเซลล์ 3 ราย เช่น bead หมายเลข 4 มีแอนติเจน A1, A80, B18, B50, C2, C6; A1, A29, B8, B45, C6, C7; A1, A69, B35, B49, C7, C12 เป็นต้น สามารถรายงานผลบวกหรือลบเท่านั้น ไม่สามารถนำผลมาคำนวณหาค่า PRA ระดับสอง คือ LABScreen PRA แต่ละเม็ด bead จะเคลือบด้วยแอนติเจน HLA class I หรือ class II จากเซลล์ 1 ราย เช่น bead หมายเลข 21 เคลือบด้วยแอนติเจน A2, A32, B42, B58, C10, C17 เป็นต้น การใช้น้ำยาชุดนี้สามารถคำนวณหาค่า PRA ได้ และนำมาใช้ในการคำนวณสิทธิ์ในการได้รับไตบริจาคจากศูนย์รับบริจาคอวัยวะสภากาชาดไทย ซึ่งผู้ที่มีค่า PRA มากกว่าร้อยละ 80 จะมีคะแนนมากกว่าผู้ที่มีค่า PRA ต่ำ ส่วนการตรวจในระดับสาม คือ single antigen bead, SAG ซึ่งในแต่ละเม็ด beads จะเคลือบแอนติเจน 1 ชนิดเท่านั้น เช่น เม็ด bead หมายเลข 21 เคลือบด้วย A32 ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้ป่วย เพราะนอกจากจะรายงานค่า PRA แล้วยังสามารถรายงานความจำเพาะต่อแอนติเจน HLA แต่ละชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีค่า PRA สูงและไม่สามารถหาความจำเพาะของแอนติบอดีได้ถ้าตรวจด้วยวิธี CDC ช่วยให้การหาอวัยวะที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ตรวจพบแอนติบอดีทั้งที่ต้องอาศัยคอมพลีเมนท์และไม่ต้องอาศัยคอมพลีเมนท์ จึงพบปัญหาความไม่สอดคล้องของผลบวกที่ตรวจพบกับผลลัพธ์ทางคลินิก ดังนั้นแต่ละห้องปฏิบัติการจึงต้องนำผลการตรวจความเข้ากันได้ระหว่างผู้ให้และผู้รับอวัยวะมาพิจารณาร่วมด้วย และเนื่องจากเป็นการอ่านผลการเปล่งแสงของสาร fluorescence ได้เป็นค่า mean fluorescence intensity (MFI) เทียบกับ negative control และค่า background ของแต่ละ bead ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยระบบคอมพิวเตอร์ จึงต้องเข้มงวดเรื่องการจัดเก็บน้ำยาให้ถูกต้องและตรวจสอบวันหมดอายุ เพราะความเสื่อมของน้ำยามีผลต่อการตรวจหาระดับความแรงและความจำเพาะของแอนติบอดี จึงอาจพบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างห้องปฏิบัติการแม้ว่าจะตรวจในตัวอย่างเดียวกัน หรือแม้แต่ในห้องปฏิบัติการเดียวกันแต่ตรวจต่างเวลากันหรือใช้ชุดน้ำยาแตกต่างกัน[28] ในกรณีที่ผู้ป่วยมีระดับ IgM สูง หรือมี immune complex จะมีผลต่อการทดสอบเช่นเดียวกัน จึงต้องเตรียมตัวอย่างตรวจด้วยการเจือจางหรือเติมสาร dithiothreitol (DTT) ก่อนนำซีรัมไปทดสอบ จะช่วยให้การแปลผลมีความชัดเจนมากขึ้น[29]

การตรวจความเข้ากันได้ (crossmatching)

จากการค้นพบความสำคัญของการตรวจความเข้ากันได้ระหว่างซีรัมของผู้ป่วยกับเซลล์ lymphocyte ของผู้บริจาคไตโดย Patel และ Terasaki ในปี ค.ศ. 1969[6] จึงต้องมีการตรวจความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยะในผู้ป่วยทุกราย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด hyperacute rejection และเป็นสาเหตุให้ไตใหม่ที่ใส่เข้าไปไม่ทำงาน การตรวจความเข้ากันได้ที่ให้ผลบวกเป็นข้อห้ามมิให้ทำการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลบวกต่อ T cell ของผู้ให้อวัยวะ[30] ได้มีการพัฒนาการตรวจให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น เพื่อใช้ในการทำนายผลทางคลินิกซึ่งควรนำผลการตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อ HLA มาช่วยในการตัดสินใจร่วมด้วย

การตรวจความเข้ากันได้ด้วยวิธี CDC

ใช้หลักในการตรวจเช่นเดียวกับการตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อ HLA ด้วยวิธี CDC เพียงแต่ใช้ซีรัมของผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับ T cells และ B cells ของผู้บริจาคอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต ซึ่งจะพบแอนติเจน HLA class I และ HLA class II บน endothelium ของไต ดังนั้นถ้าให้ผลบวกในการตรวจ

ความเข้ากันได้ด้วยวิธี CDC แสดงว่าผู้ป่วยมีแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน HLA ของผู้บริจาคหรือที่เรียกว่า donor specific antibody (DSA) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นข้อห้ามมิให้ทำการปลูกถ่ายอวัยวะ แต่ข้อเสียของวิธี CDC คือมีความไวในการตรวจต่ำ ดังนั้นในกรณีที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีในระดับต่ำ ทำให้ตรวจไม่พบจึงเกิดผลลบปลอม แต่สามารถเพิ่มความไวได้โดยการเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาให้นานขึ้น 1 เท่าหรือเติม antihuman globulin (AHG-CDC) ลงไป[31] การเกิดผลบวกปลอมพบได้ในกรณีที่ซีรัมของผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับเซลล์ของตนเอง (autoantibody) หรือมีแอนติบอดีต่อ HLA ชนิด IgM หรือมี non-HLA IgG โดยเฉพาะการตรวจความเข้ากันได้ด้วย B cells อาจพบผลบวกปลอมได้บ่อย จึงต้องเตรียมตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยก่อนนำมาตรวจความเข้ากันได้ด้วยการเติม DTT หรือใช้ความร้อนไปทำลาย disulfide bonds ของ IgM ซึ่งต้องทำการตรวจความเข้ากันได้ด้วยตัวอย่างซีรัมที่ไม่ได้เติม DTT และทดสอบกับ T cells และ B cells ของตนเองร่วมด้วย เพื่อแยกแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ของตนเองออกจากเซลล์ของผู้บริจาคอวัยวะ[32] การที่ผลการตรวจความเข้ากันได้ให้ผลบวกกับ B cells มากกว่า T cells อาจเป็นเพราะว่าแอนติเจน HLA class I แสดงออกบน B cells มากกว่า T cells และสัมพันธ์กับการสลัดอวัยวะที่ได้รับค่อนข้างสูง[33]

การตรวจความเข้ากันได้ด้วยวิธี flow cytometry

หลักการตรวจความเข้ากันได้โดยวิธี flow cytometry crossmatch (FCXM) แตกต่างจากวิธี CDC ตรงที่สามารถตรวจแอนติบอดีต่อ HLA ที่อาศัยคอมพลีเมนท์และไม่อาศัยคอมพลีเมนท์ และตรวจหาเฉพาะ immunoglobulin ชนิด IgG ซึ่ง IgG ในแต่ละ subclass มีคุณสมบัติในการตรึงคอมพลีเมนท์แตกต่างกัน โดยพบว่า IgG1 และ IgG3 มีความแรงในการตรึงคอมพลีเมนท์มากกว่า IgG2 และ IgG4[34] พบว่าผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 15 ที่จะปลูกถ่ายอวัยวะครั้งแรกและมากกว่าร้อยละ 30 ในผู้ป่วยที่จะปลูกถ่ายอวัยวะครั้งที่ 2 ให้ผลการตรวจความเข้ากันได้โดยวิธี FCXM เป็นบวก ในขณะที่ผลการตรวจความเข้ากันได้ด้วยวิธี CDC หรือ AHG-CDC เป็นลบ ทำให้เกิดการสูญเสียอวัยวะที่ใส่เข้าไปภายใน 3 เดือนหลังการปลูกถ่ายอวัยวะในครั้งแรก[35,36] หรือภายใน 1 ปีหลังการปลูกถ่ายอวัยวะครั้งที่ 2[37,38] ดังนั้นการตรวจความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM จึงควรดูผลการตรวจหาความแรงและความจำเพาะของแอนติบอดีโดยวิธี solid-phase immunoassays ร่วมด้วย[37] เพราะในกรณีที่ไม่พบแอนติบอดีต่อ HLA แต่ผลการตรวจความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM ให้ผลบวก อาจจะไม่มีผลต่อการอยู่รอดของอวัยวะที่ได้รับการปลูกถ่ายเข้าไป[39]

สรุป

ความเข้าใจในพื้นฐานของวิธีการตรวจความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้แพทย์ใช้ในการตัดสินใจที่จะทำการปลูกถ่ายอวัยวะ ดังนั้นผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการต้องมีความถูกต้องเป็นที่น่าเชื่อถือ ความไว และความจำเพาะของวิธีการทดสอบ จึงเป็นสิ่งที่ผู้ปฏิบัติงานต้องให้ความสำคัญ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วย และทำให้แพทย์ให้การรักษาอย่างเหมาะสมกับผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. *Hariharan S, Pirsch JD, Lu CY, et al. Pancreas after Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol 2002;13:1109-18.*
2. *Siemionow MZ, Kulahci Y, Bozkurt M. Composite tissue allotransplantation. Plast Reconstr Surg 2009;124(Suppl.6):e327-39.*
3. *Sheldon S, Poulton K. HLA typing and its influence on organ transplantation. Methods Mol Biol 2006;333:157-74.*
4. *Matesanz R, Miranda B. A decade of continuous improvement in cadaveric organ donation : the Spanish model. J Nephrol 2002;15:22-8.*
5. *Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. Immunity 2001;14:347-56.*
6. *Patel R, Terasaki PI. Significance of the crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med 1969;280:735-9.*
7. *Arnold ML, Pei R, Spriewald B, et al. Anti-HLA class II antibodies in kidney retransplant patients. Tissue Antigens 2005;65:370-8.*
8. *Mucznski KA, Ekle DM, Coder DM, et al. Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells:characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. J Am Soc Nephrol 2003;14:1336-48.*
9. *Dausset J, Rapaport FT, Legrand L, et al. Studies on transplantation antigens (HL-A) by means of skin grafts from 90 children onto their fathers. Nouv Rev Fr Hematol 1969;9:215-29.*
10. *Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 1964;204:998-1000.*
11. *Robinson J, Waller MJ, Parham P, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence database for the study of the major histocompatibility complex. Nucleic Acids Res 2003;31:311-4.*
12. *Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. Tissue Antigens 1991;37:197-204.*
13. *Rozemuller EH, Tilanus MG. Bioinformatics: analysis of HLA sequence data. Rev Immunogenet 2000;2:492-517.*
14. *Eng HS, Leffel MS. Histocompatibility testing after fifty years of transplantation. J Immunol Methods 2011;369:1-21.*
15. *Opelz G, Dohler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. Transplantation 2007;84:137-43.*

16. Zachary AA, Hart JM, Lucas DP, Leffell MS. The cost of mismatching. Clin Transpl 2007:261.
17. Meier-Kriesche HU, Scornik JC, Susskind B, et al. A lifetime versus a graft life approach redefines the importance of HLA matching in kidney transplant patients. Transplantation 2009;88:23-9.
18. Macdonald WA, Chen Z, Gras S, et al. T cell allorecognition via molecular mimicry. Immunity 2009;31:897-908.
19. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, et al. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatch: relationship to renal transplant outcome. Transplantation 1986;42:608-13.
20. Rodey GE, Fuller TC. Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. Crit Rev Immunol 1987;7:229-67.
21. Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies-an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. Transplantation 1992;55:192-6.
22. Wang G, Tarsitanic C, Takemura S, et al. ELISA assay for the detection of specific antibodies to class I HLA antigens in transplant patients with panel reactive antibodies. Hum Immunol 1996;49:109.
23. Pei R, Wang C, Tarsitani C, et al. Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. Hum Immunol 1998;59:313-22.
24. Pei R, Lee J-H, Shih N-J, et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Transplantation 2003;75:43-9.
25. Gebel HM, Bray RA. Sensitization and sensitivity: defining the unsensitized patient. Transplantation 2000;69:1370-4.
26. Pretl K, Chesterton KA, Scholander JT, et al. Accurate rapid characterization of HLA specific antibodies using Luminex technology. Hum Immunol 2003;64(Suppl 1):S108.
27. Tait B, Hudson F, Cantwell L, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. 2009; Nephrology;14:247-54.
28. Zachary AA, Sholander JT, Houp JA, et al. Using real data for a virtual crossmatch. Hum Immunol 2009;70:574-9.
29. Kosmoliaptsis V, O'Rourke C, Bradley JA, et al. Improved luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. Hum Immunol 2010;71:45-9.
30. Stiller CR, Abrahams S, Fung M, et al. Lymphocyte-dependent antibody and renal graft rejection. Lancet 1975;1(7913):953-4.
31. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, et al. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. Hum Immunol 1997;56:94-105.
32. Pellegrino MA, Belvedere M, Pellgrino AG, et al. B peripheral lymphocytes express more HLA antigens than T peripheral lymphocytes. Transplantation 1978;25:93-5.
33. Mahoney RJ, Taranto S, Edwards E. B-Cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United States transplant recipients. Hum Immunol 2002;63:324-35.
34. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, et al. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. Transplantation 2011;92:41-7.
35. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. J Am Soc Nephrol 2001;12:2807-14.
36. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR, et al. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. Transplantation 1990;49:527-35.
37. Kerman RH, Van Buren CT, Lewis RM, et al. Improved graft survival for flow cytometry and antihuman globulin crossmatch-negative retransplant recipients. Transplantation 1990;49:52-6.
38. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, et al. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. Transplantation 1998;66:1827-32.
39. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, et al. Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology. Immunol Res 2004;29:41-54.