นิพนธ์ต้นฉบับ

ความชุกและการวินิจฉัย Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia โดยใช้เทคนิค Flow Cytometry

จารุพร พรหมวงศ์ และ จรินทร์ บัวแก้ว

หน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ : *Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) เป็นความผิดปกติที่ทารกมีเกล็ดเลือดในร่างกายต่ำซึ่งเป็นผลมาจากมารดาสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของทารก เนื่องจากทารกมีหมู่เกล็ดเลือดที่ถ่ายทอดจากบิดาซึ่งแตกต่างจากมารดาจึงเกิด alloimmunisation ของระบบ human specific platelet antigen (HPA) ดังนั้นจึงได้ศึกษาความชุกของการเกิด NAIT ในทารกไทยในภาคใต้ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์และศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด โดยได้ศึกษาย้อนหลัง 4 ปีในทารกแรกคลอดที่มีเกล็ดเลือดต่ำและส่งตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด เทคนิคการตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดใช้ วิธี solid phase red cell adherent assay (SPRCA) และ flow cytometry จากการศึกษาพบความชุกการเกิด NAIT เท่ากับ 1:11,529 (ร้อยละ 0.009) ของทารกคลอดมีชีวิต ในช่วงเวลาศึกษามีทารกที่ได้รับการส่งตรวจแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดทั้งหมด 9 ราย และมี 1 รายที่ตรวจพบแอนติบอดี พบว่าเทคนิค flow cytometry ตรวจวินิจฉัยผู้ป่วย NAIT ได้มากกว่าวิธี SPRCA อัตราการเกิด NAIT ในทารกชาวไทยพบต่ำมากแต่ก็ใกล้เคียงกับการศึกษาอัตราการเกิดที่พบในทารกชาวบริติชและชาวไอริช เนื่องจากภาวะแทรกซ้อนจากการเกิด NAIT มีความรุนแรงได้หลายระดับตั้งแต่มีอาการเล็กน้อยจนถึงมีเลือดออกในสมอง ดังนั้นการวินิจฉัยด้วยเทคนิคการทดสอบที่มีความไวสูงและการรักษาที่รวดเร็วจะช่วยทำให้ทารกมีอัตราพิการและเสียชีวิตลดลง*

Key Words : ● *Neonatal alloimmune thrombocytopenia* ● *SPRCA* ● *Flow cytometry* ● *Prevalence*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2553;20:179-89.

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) เป็นความผิดปกติสืบเนื่องจากทารกมีเกล็ดเลือดในกระแสเลือดต่ำซึ่งเป็นผลจากมารดาสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของทารก หญิงตั้งครรภ์ที่มีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดชนิด IgG จะสามารถผ่านรกและเข้าสู่กระแสโลหิตของทารกในครรภ์ทำให้เกิด antenatal และ neonatal thrombocytopenia ได้ ซึ่งพยาธิสรีระวิทยาคล้ายกับการเกิด hemolytic disease of the fetus/newborn (HDF/N) ทารกจะมีหมู่ของเกล็ดเลือดที่ถ่ายทอดมาจากบิดาซึ่งแตกต่างจากมารดาและ เกล็ดเลือดของทารกในครรภ์จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมารดาให้สร้าง platelet alloantibody แล้วแอนติบอดีนี้จะผ่านรกมาที่กระแสเลือดของทารกในครรภ์มีผลทำให้เกล็ดเลือดของทารกถูกทำลาย ความชุกของการเกิด NAIT พบได้แตกต่างกัน การศึกษาโดยการตรวจกรองแอนติบอดีในหญิงตั้งครรภ์ชาวคอเคเชียนพบอัตราการเกิด NAIT ประมาณ 1:1,000- 1:2,000 ของการคลอดมีชีวิต (live births) และเป็นสาเหตุหลักของการเกิด intracranial hemorrhage จาก thrombocytopenia ของทารก[1-8] การเกิด NAIT พบในทารกครรภ์แรกได้ถึงร้อยละ 50-60 และอาการมักจะหายเองใน 2-3 สัปดาห์หลังคลอด[9-10] อาการมีได้หลายระดับตั้งแต่ไม่มีอาการจนถึงมีภาวะเลือดออกรุนแรงคือเกิด intracranial hemorrhage ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 10-30 และประมาณร้อยละ 50 จะเกิดขึ้นกับทารกขณะอยู่ในครรภ์[2,9-10] ในทารกครรภ์ต่อมาก็เกิด NAIT ได้เช่นกันโดยระดับความรุนแรงอาจเท่าเดิมหรือรุนแรงกว่าครรภ์แรก การทดสอบเพื่อวินิจฉัย NAIT เป็นปัญหาอย่างหนึ่งเพราะไม่ได้ทำกันแพร่หลายและเทคนิคในการตรวจค่อนข้างซับซ้อน ในมารดาที่เคยมีทารกเป็น NAIT และต้องการมีบุตรอีกควรได้รับการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด หมู่ของเกล็ดเลือดมีหลายระบบเช่น human leukocyte antigen (HLA) class I และ human specific platelet antigens (HPA-1 – HPA-15) ระบบที่เกี่ยวข้องกับการเกิด NAIT ส่วนใหญ่จะเป็นระบบ HPA ชนิดแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิด NAIT ใน

ได้รับต้นฉบับ 20 มิถุนายน 2553 ให้ลงตีพิมพ์ 18 กรกฎาคม 2553

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ผศ.พญ.ดร.จารุพร พรหมวงศ์ หน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90110 e-mail : pcharupo@hotmail.com

ชาวคอเคเซียนคือ anti-HPA-1a โดยในประชากรคอเคเซียนพบมีหมู่ HPA-1a negativeประมาณร้อยละ 2 หญิงตั้งครรภ์ที่มีหมู่เกล็ดเลือด HPA-1a negative และตั้งครรภ์ทารกที่มีหมู่ HPA-1a positive จะมีการสร้าง platelet alloantibody พบประมาณร้อยละ 10[11-12] ความชุกของการเกิด NAIT ในทารกชาวไทยยังไม่ชัดเจนเนื่องจากข้อจำกัดในการตรวจสืบค้นในห้องปฏิบัติการที่ทำได้ไม่กี่แห่งในประเทศไทย เทคนิคการทดสอบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดมีหลายเทคนิคที่มีการใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการต่างๆ เช่น solid phase red cell adherent assay (SPRCA), flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) เป็นต้น[13-16] ซึ่งแต่ละเทคนิคก็มีข้อดีแตกต่างกัน การทดสอบด้วย MAIPA เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงและถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบันแต่วิธีการค่อนข้างซับซ้อน การตรวจด้วย ELISA ก็มีชุดตรวจสำเร็จรูปที่สามารถซื้อได้จากต่างประเทศแต่ควรตรวจพร้อมกันทีละหลายรายและอาจไม่คุ้มกับห้องปฏิบัติการที่มีผู้ป่วยจำนวนไม่มาก ส่วนการตรวจด้วยเทคนิค SPRCA และ flow cytometry ค่อนข้างเหมาะสมเทคนิคไม่ซับซ้อนและราคาไม่สูงมากเกินไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอัตราการเกิด NAIT ในทารกชาวไทยในภาคใต้ของประเทศไทยและเพื่อศึกษาเทคนิคการตรวจวินิจฉัย NAIT

วิธีการศึกษา

ได้รวบรวมข้อมูลที่บันทึกทารกที่ส่งตรวจเพื่อสืบค้นสาเหตุการเกิด neonatal thrombocytopenia ในช่วงปี พ.ศ. 2549-2552 ในหน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งทารกทุกรายที่ส่งตรวจมีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับ NAIT และผ่านการปรึกษากับแพทย์เวชศาสตร์บริการโลหิต ทารกทุกรายได้รับการตรวจกรอง platelet alloantibody ในซีรัมมารดาและตรวจ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมของมารดากับเกล็ดเลือดของบิดาด้วยเทคนิค SPRCA หรือ SPRCA และ flow cytometry

การทดสอบ platelet antibody

ตัวอย่างการทดสอบโดยใช้เลือดมารดา clotted blood และ ACD anti-coagulated blood (ACD blood) อย่างละ 6 มิลลิลิตร (มล.) และเลือดบิดา ACD blood 6 มล. การทดสอบประกอบด้วยการตรวจกรอง platelet alloantibodies ทั้งชนิด HLA และ HPA antibodies โดยใช้ซีรัมมารดาทดสอบกับเกล็ดเลือดของผู้บริจาคเลือดทั่วไปหมู่เลือด O จำนวน 4-6 ราย (untreated และ chloroquine treated platelet panels) และการทำ platelet crossmatching โดยใช้ซีรัมของมารดาทำปฏิกิริยากับเกล็ดเลือดของบิดา ในทุกการทดสอบมี HLA antibody positive control ซึ่งเตรียมจากซีรัมผู้ป่วยที่มี platelet refractoriness จาก HLA alloimmunisation และ HPA antibody positive control (anti-HPA-1a) ซึ่งได้รับจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และ negative control serum เตรียมจากซีรัมผู้บริจาคโลหิตชายหมู่เลือด AB ที่ตรวจกรองแล้วไม่มี red cell irregular antibody, HLA และ HPA antibodies (ตรวจด้วยวิธี lymphocytotoxicity และ SPRCA ตามลำดับ) และใช้เกล็ดเลือดมารดาเป็น autologous control

วิธีการเตรียม platelet suspension สำหรับการทดสอบ โดยเตรียมจาก ACD blood 6 มล. ของเลือดผู้บริจาคทั่วไป (platelet panels) เลือดของบิดาและ autologous platelet จากเลือดมารดาดังต่อไปนี้

1. การเตรียม platelet suspension เพื่อการทดสอบวิธี SPRCA

1.1 Untreated platelets panel เตรียมโดยนำเลือดมาปั่นที่ 500 x g เป็นเวลา 10 นาที แยก platelet rich plasma ออกแล้วนำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70° เซลเซียส (ซ.) นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง นำมาละลายแล้วปั่นล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย 0.2% BSA ใน 0.9% NaCl (washing solution) ที่ 1,000 x g นาน 4 นาที และ fix platelet ด้วย 1% paraformaldehyde นาน 5 นาที ล้าง 3 ครั้งแล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมล.

1.2 Chloroquine treated platelets panel เพื่อกำจัด HLA antigen ออกจากเกล็ดเลือดให้เหลือเฉพาะหมู่ HPA เตรียมโดยนำ platelets ที่ผ่านการแช่แข็งและล้าง 3 ครั้งที่เตรียมในข้อ 1.1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (มคล.) incubate กับ 0.2 M chloroquine disulphate 2 มล. ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °ซ.) นาน 30 นาทีแล้วปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย washing solution จากนั้น fix ด้วย 1% paraformaldehyde นาน 5 นาที ล้าง 3 ครั้งด้วย washing solution แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^8$ เซลล์/มล.

2. การเตรียม platelet suspension เพื่อการทดสอบวิธี flow cytometry

2.1 Untreated platelets panel เตรียมจาก ACD blood โดยนำมาปั่นที่ 500 x g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอา platelet rich plasma มาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย washing solutionที่ 1,000 x

g นาน 4 นาที แล้ว fix ด้วย 1% paraformaldehyde นาน 5 นาที ปั่นล้างอีก 3 ครั้งแล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^8$ เซลล์/มล.

2.2 Chloroquine treated platelets panel นำ untreated platelet suspension ในข้อ 2.1 ปริมาณ 100 มคล. มา incubate กับ 0.2 M chloroquine disulphate 2 มล.ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีแล้วปั่นล้าง 3 ครั้งจากนั้น fix ด้วย 1% paraformaldehyde นาน 5 นาที ปั่นล้างอีก 3 ครั้งแล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^8$ เซลล์/มล.

วิธีการทดสอบโดยวิธี SPRCA

ประยุกต์จากวิธีของภาวิณีและคณะ[17] และ Lown และคณะ[18] โดยการเคลือบ microtiter U plate ด้วย antihuman thrombocyte ความเข้มข้น 20 มคก./มคล. incubateไว้ที่ 22°ซ. นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง plate 3 ครั้งด้วย 0.2% BSAใน PBS ครั้งสุดท้ายซับให้แห้งแล้วหยด platelet suspensions ทั้ง untreated และ chloroquine treated platelets panels ของผู้บริจาคทั่วไป และ autologous platelets ของมารดา หลุมละ 50 มคล. และนำ plate ไปปั่นที่ 1,700 x g นาน 2 นาที กำจัด supernatant ทิ้งแล้ว incubate plate ไว้ที่ 37°ซ. นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาล้าง plate 6 ครั้งและครั้งสุดท้ายซับให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย 1.9% glycine 100 มคล.และหยดซีรัมมารดาที่ต้องการทดสอบ negative control และ positive controls (HLAและHPA antibodies) อย่างละ 50 มคล. จากนั้น incubate plateไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาล้าง plate 6 ครั้ง ครั้งสุดท้ายซับให้แห้งแล้วเติม anti-human IgG 50 มคล.และตามด้วย 0.4% red cell suspension (indicator cells) 50 มคล. ซึ่งเตรียมจากเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาค group O Rh positive ที่ sensitize ด้วย anti-D จากนั้นนำ plate มาปั่นที่ 2,000 x g นาน 2 นาที การอ่านผลจะรายงานผลบวกเมื่อมีการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงเต็มหลุม ผลลบเมื่อเม็ดเลือดแดงตกลงเป็นเม็ดกระดุม ถ้าให้ปฏิกิริยาบวกกับเกล็ดเลือดอย่างน้อย 2 ชนิดในแต่ละ panel แสดงว่าผู้ป่วยรายนั้นอาจมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด

วิธีการทดสอบโดย Flow cytometry

ประยุกต์จากวิธีของ International Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Keifel และคณะ[19] และ Kohler และคณะ[20] โดยใช้ untreated และ chloroquine treated platelet suspension panels ของผู้บริจาคและ autologous platelets ของมารดาอย่างละ 50 มคล. นำมา incubate กับซีรัมมารดาที่จะทดสอบ negative control และ positive controls (HLA และ HPA antibodies) อย่างละ 50 มคล.ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย washing solution โดยปั่นที่ 1,000 x g นานครั้งละ 4 นาที จากนั้นนำเกล็ดเลือดมา incubate กับ fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (Fab)'2 fragment goat anti-human IgG (เจือจาง 1:50) ปริมาตร 50 มคล. และ phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD41 mouse monoclonal antibody (แอนติบอดีต่อ platelet antigen) ปริมาตร 5 มคล. แล้วนำไป incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นล้าง 1 ครั้งแล้ว resuspend เกล็ดเลือดด้วย washing solution 500 มคล. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (Cytomics FC500, Beckman Coulter, USA) โดยวิเคราะห์ 10,000 เซลล์ และ gate platelet จาก forward scatter x side scatter จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ FITC จาก platelets ที่ติดสี CD41PE (รูปที่ 1) ถ้าพบว่า mean fluorescence intensity (MFI) ของ FITC มากกว่า 25% เมื่อเทียบกับ negative control ถือว่าให้ผลบวก หากมีเกล็ดเลือดที่ให้ผลบวกอย่างน้อย 2 ชนิดในแต่ละ panel แสดงว่าผู้ป่วยรายนั้นมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด[21]

การตรวจ platelet crossmatching

เป็นการทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมของมารดาว่ามีความจำเพาะต่อเกล็ดเลือดของบิดาหรือไม่ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่ามารดาได้รับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อหมู่เกล็ดเลือดทารกส่วนที่ได้รับจากบิดา การทดสอบเหมือนกับการตรวจกรองแอนติบอดีของมารดา เพียงแต่ใช้เกล็ดเลือดของบิดาแทน platelet panels

การทดสอบเพื่อแยก HLA antibody และ HPA antibody

การตรวจ platelet antibody ที่ได้ผลบวกทั้งต่อ untreated platelets และ chloroquine treated platelet panels ซึ่งในซีรัมที่ตรวจอาจมี HPA antibody อย่างเดียวหรืออาจมีทั้ง HLA และ HPA antibodies ก็ได้ สามารถตรวจยืนยันชนิดของ HLA แอนติบอดีโดยวิธี standard lymphocytotoxicity[13] และโดยวิธี anti-HPA adsorption ซึ่งได้พัฒนาขึ้นเอง วิธีการตรวจ anti-HPA antibody adsorption ทำโดยใช้ซีรัมมารดา 1 มล. incubate กับ chloroquine treated platelets ปริมาณ 0.5 มล.ที่เตรียมจากเลือดผู้บริจาคที่ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดี โดย incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 1 ชั่วโมง เขย่ากลับหัวทุก 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นที่ 1,000 x g นาน 4 นาที จากนั้นเก็บ supernatant ไว้ใช้เป็น adsorbed serum นำ adsorbed serum ที่ได้ไปทดสอบซ้ำกับ untreated platelets และ chloroquine treated platelets ของบิดาตามวิธีการทดสอบ flow cytometry พร้อมกับ negative control และ positive controls ควบคู่กับ unadsorbed serum ของมารดา

ผลการศึกษา

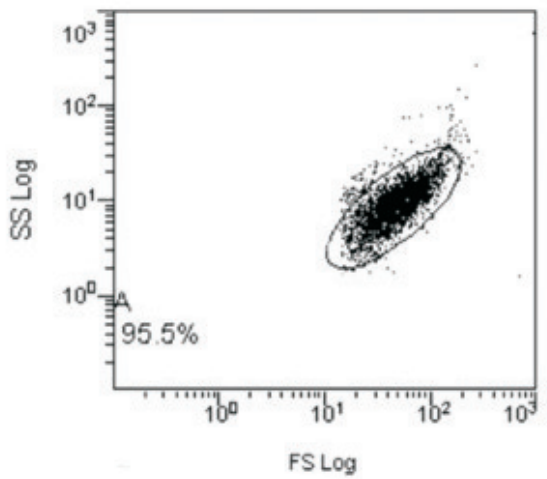
ช่วงเวลาที่ศึกษาในปี พ.ศ. 2549-2552 ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์มีทารกที่ได้ส่งตรวจเพื่อวินิจฉัย NAIT จำนวนทั้งหมด 9 รายจากทารกที่คลอดมีชีวิตทั้งหมด 11,529 ราย โดยส่งตรวจจำนวนเฉลี่ย 1-4 ราย/ปี อาการแสดงของทารกมีทั้งภาวะเลือดออกและไม่มีเลือดออก ผลตรวจเลือดในทารกพบ 7 รายจาก 9 รายมีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่า 50,000/ลบ.มม. การตรวจหา platelet antibody ส่วนใหญ่ตรวจด้วยวิธี SPRCA ผลตรวจ platelet antibody ในเลือดมารดาโดยใช้ platelets panels หมู่เลือด O และ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมมารดาและเกล็ดเลือดของบิดา พบมีทารก 1 รายจากทั้งหมด 9 ราย ที่ผลตรวจ HPA platelet alloantibody positive โดยวิธี flow cytometry (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลการทำ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมมารดาและเกล็ดเลือดบิดาพบว่า positive โดยเทคนิค flow cytometry (รูปที่ 2) แต่ผลการตรวจเดียวกันนี้ให้ผล negative ด้วยเทคนิค SPRCA (ตารางที่ 2) ผลตรวจแยกชนิด platelet alloantibody ของ HPA และ HLA antibodies ในซีรัมมารดาโดยวิธีการ adsorb anti-HPA ออก (รูปที่ 3, 4) โดยวิธี flow cytometry และการตรวจวิธี lymphocytotoxicity พบ HLA antibody negative ทั้งสองการทดสอบ

ตัวอย่างอาการทางคลินิคของผู้ป่วยที่มีผลตรวจสอดคล้องกับ NAIT

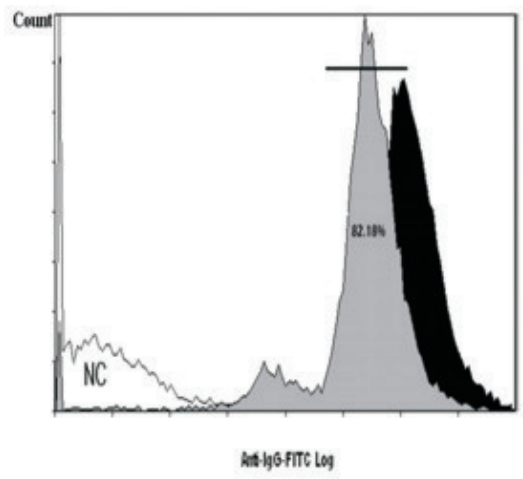
ทารกหญิงอายุ 22 วันส่งต่อมาจากโรงพยาบาลใกล้เคียงด้วยเรื่องเกล็ดเลือดต่ำ เมื่อทารกอายุ 3 วันมีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำ มีจุดเลือดออกตามแขนขา ตรวจเลือดพบ hematocrit (Hct) ร้อยละ 40.3 hemoglobin (Hb) 14.3 ก./ดล. platelet count 11,000/ลบ.มม. ผู้ป่วยได้รับ platelet concentrate 1 ยูนิต platelet count ขึ้นเป็น 188,000/ลบ.มม. หลังจากนั้นทารกสบายดีจึงได้กลับบ้าน เมื่อทารกอายุ 19 วัน ทารกมีอาการท้องอืด ถ่ายอุจจาระมีเลือดปน 3 ครั้ง จึงได้ไปตรวจที่โรงพยาบาลใกล้บ้านพบว่ามีเกล็ดเลือดต่ำและได้รับการรักษาด้วย packed red cell (PRC)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนทารกทั้งหมดที่คลอดมีชีวิตในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ในระหว่างปีพ.ศ. 2549-2552 และจำนวนทารกที่ส่งตรวจเพื่อสืบค้นภาวะ NAIT (pos: positive platelet alloantibody, neg: negative platelet alloantibody)

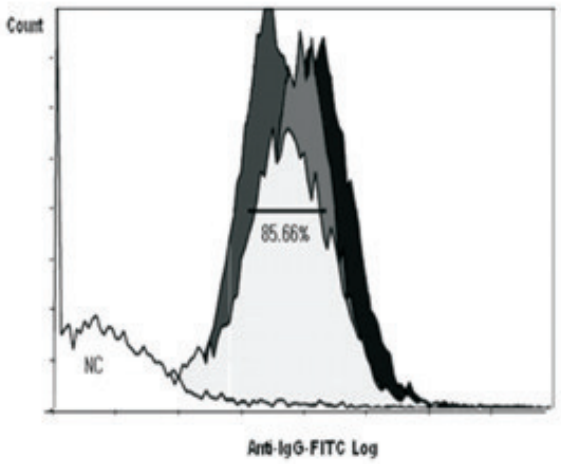
ปี พ.ศ.	จำนวนทารกคลอดมีชีวิต(ราย)	จำนวนทารกที่ส่งตรวจ(ราย)	อาการแสดงและ platelet count (plt./mm^3)	เทคนิคที่ตรวจ	ผลตรวจ platelet alloantibodies
2549	2,672	1	1. Thrombocytopenia, plt. 46,000/mm^3	SPRCA (ส่งตรวจศูนย์บริการโลหิตฯ)	1. neg
2550	2,886	2	1.Thrombocytopenia, low birth weight, plt. 41,000/mm^3 2. Thrombocytopenia, jaundice, plt. 48,000/mm^3	SPRCA	1. neg 2. neg
2551	2,883	4	1. Fetal distress, intraventricular bleeding and death, plt 96,000/mm^3 2. Thrombocytopenia, plt. 27,000/mm^3 3. Thrombocytopenia, plt. 72,000/mm^3 4. Thrombo cytopenia, plt. 22,000/ mm^3	SPRCA	1. neg 2. neg 3. neg 4. neg
2552	3,088	2	1. Petichiae, gastrointestinal bleeding, plt. 32,000/mm^3 2. Thrombocytopenia with sepsis?, plt.15,000/mm^3	Flow cytometry และ SPRCA	1. pos by flow cytometry 2. neg
รวม	**11,529**	**9**			**pos 1/9 ราย**



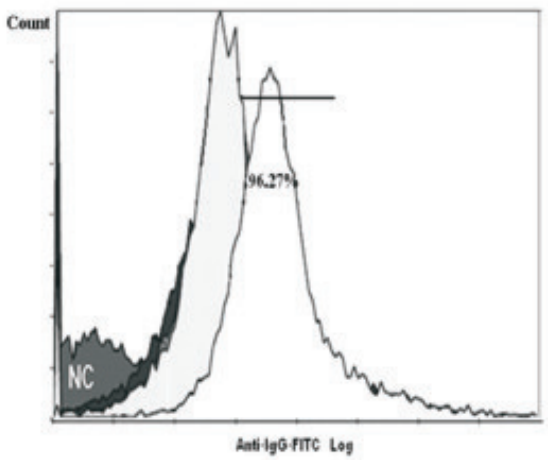
(A) Platelet gate



(B) Negative control (white), HLA antibody (gray) และ HPA antibody positive controls (black)



(C) Untreated platelet vs NC

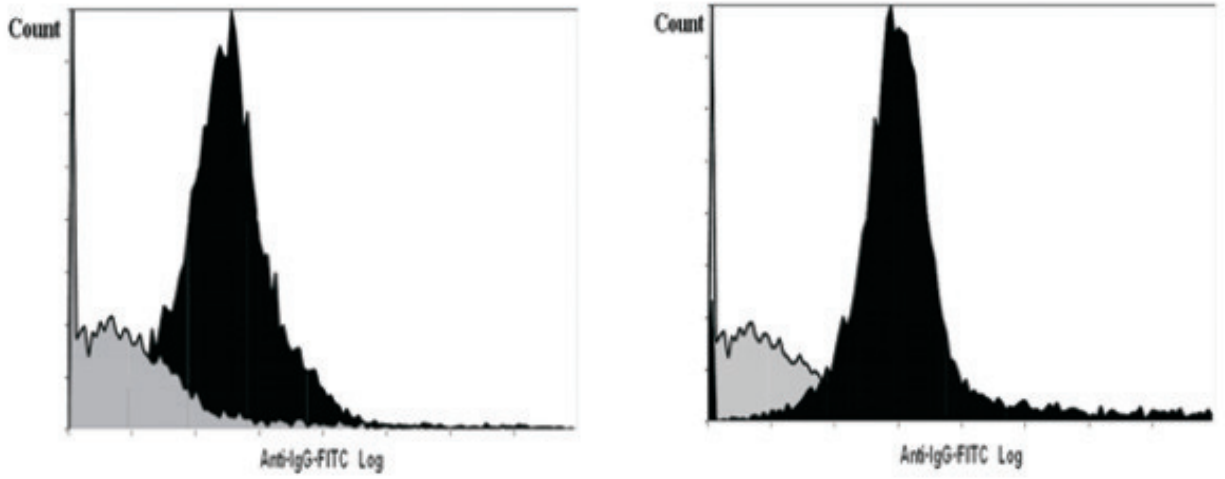


(D) Chloroquine treated platelet vs NC

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจกรองแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในซีรัมมารดาโดยใช้ target platelets จากผู้บริจาค 4 ราย (A) แสดงผล dot plot ของ platelet gate (B) Histogram แสดงผลจาก negative control (NC), HLA antibody positive control (PC1) และ HPA antibody positive control (PC2) ทดสอบกับ untreated platelets (untreated) และchloroquine treated platelets (treated) (C) Histogram แสดงผลการทดสอบซีรัมมารดากับ untreated platelets panel (MFI เท่ากับ 85.66%, 90.26%, 91.22% และ 91.65%) เปรียบเทียบกับ negative control และ (D) Histogram แสดงผลการทดสอบระหว่างซีรัมมารดากับ chloroquine treated platelet panel (MFI เท่ากับ 89.17%, 75.27%, 86.72% และ 96.27 %) เปรียบเทียบกับ negative control

transfusion 40 มล. antibiotic และ hydrocortisone 15 mg iv. ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน ผลตรวจเลือดของทารก complete blood count (CBC) ดังตารางที่ 3 เนื่องจากผู้ป่วยมีเกล็ดเลือดต่ำตลอดจึงถูกส่งต่อมารักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ทารกเป็นบุตรคนแรกคลอดครบกำหนดด้วยวิธีผ่าตัดหน้าท้องในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ น้ำหนักแรกคลอด 3,198 กรัมและ APGAR score 9,10 หลังคลอดทารกมีอาการปกติ มารดาอายุ 25 ปีมีปัญหาระหว่างคลอดเป็น severe preeclampsia และหลังคลอดได้รับการวินิจฉัยเป็น HELLP syndrome ตรวจร่างกายแรกรับทารกเมื่ออายุ 22 วัน พบว่า vital signs อยู่ในเกณฑ์ปกติ ตรวจร่างกายทั่วไปปกติ ไม่พบตับม้ามโตและไม่มีจุดเลือดออก ผู้ป่วยได้รับไว้รักษาในโรงพยาบาลและส่งตรวจหา platelet antibody

ผลการทดสอบพบมารดามีหมู่เลือด A บิดามีหมู่เลือด B ทารกมีหมู่เลือด AB และมีผลตรวจ direct antiglobulin test ใน



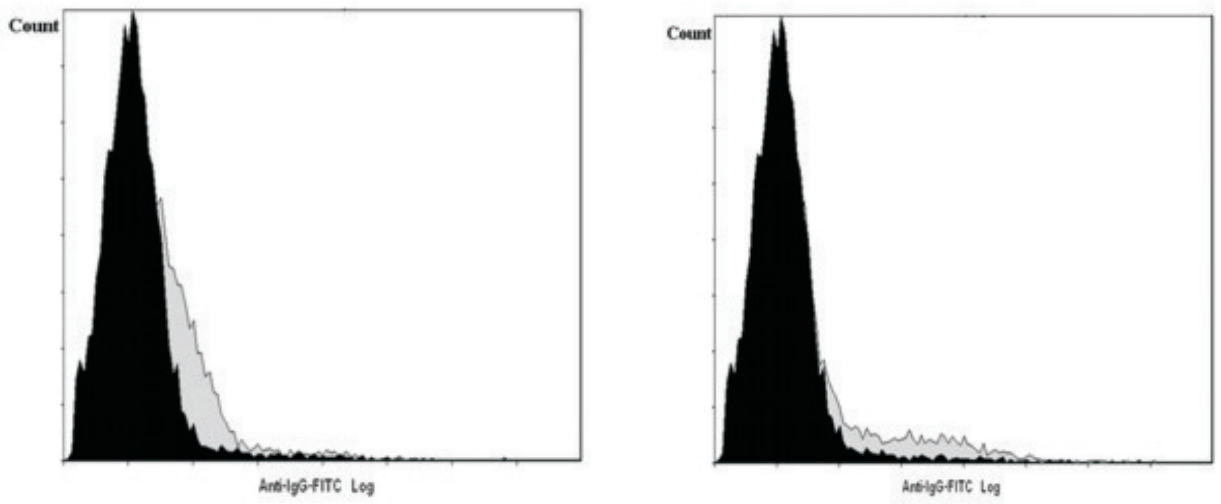
(A) Untreated platelets (black) vs NC (gray) (B) Chloroquine treated platelets (black) vs NC (gray)

รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมมารดากับเกล็ดเลือดของบิดา (A) untreated platelets (contained HLA and HPA antigens) เปรียบเทียบกับ negative control (NC) ได้ผลpositive (MFI = 74.63%) และ (B) chloroquine treated platelets (contained only HPA antigens) เปรียบเทียบกับ negative control ได้ผล positive HPA alloantibody (MFI = 78.64%)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจ platelet alloantibody ในซีรัมมารดาของทารกที่ผล NAIT positiveโดยใช้เทคนิค SPRCA และ flow cytometry (pos: positive, neg: negative, NT: not tested)

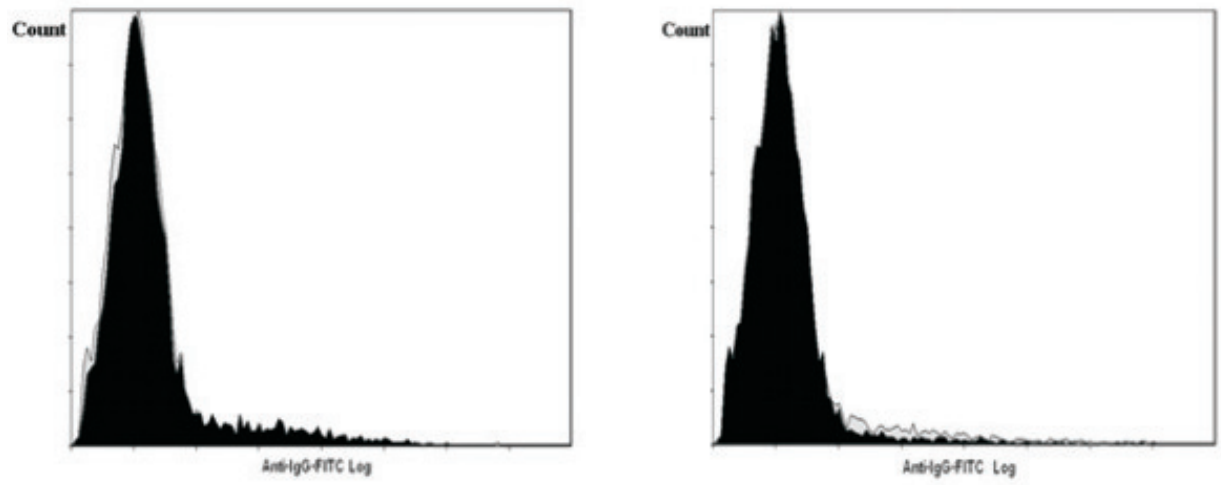
Mother's serum	**การทดสอบ platelet alloantibody**			
	Flow cytometry		**SPRCA**	
	Untreated platelets	**Chloroquine treated platelets**	**Untreated platelets**	**Chloroquine treated platelets**
Unadsorbed mother's serum				
- Random platelets	pos	pos	neg	neg
- Father's platelet (crossmatching)	pos	pos	neg	neg
- Mother's platelet (autologous)	neg	neg	neg	neg
HPA antibody adsorbed serum			NT	NT
- Random platelets	neg	neg		
- Father's platelet (crossmatching)	neg	neg		

ทารกเป็นลบ ผลตรวจ indirect antiglobulin test ในมารดาเป็นลบ ตรวจ platelet alloantibody ด้วยเทคนิค SPRCAในซีรัมมารดาทั้ง HPA และ HLA alloantibodies screening ได้ผลลบและ platelet autoantibody ได้ผลลบ การตรวจ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมมารดาและเกล็ดเลือดบิดาได้ผลเป็นลบ ตรวจ platelet antibody ซ้ำด้วยเทคนิค flow cytometry กับ platelet panels พบ platelet alloantibody ในซีรัมมารดาได้ผล positive ทั้ง treated และ untreated platelets panels (รูปที่1) และการทำ platelet crossmatching ระหว่างซีรัมมารดาและเกล็ดเลือดบิดาด้วยเทคนิค flow cytometry ได้ผล positive (รูปที่ 2) การ



(A) Untreated platelet (gray) vs NC (black) (B) Chloroquine treated platelets (gray) vs NC (black)

รูปที่ 3 แสดงผลการตรวจ anti-HPA adsorbed serum ของมารดาโดยใช้เกล็ดเลือดของบิดาเป็น target cells (A) untreated platelets (MFI = 4.97%) และ (B) chloroquine treated platelets (MFI = 8.06%) เปรียบเทียบกับ negative control (NC)



(A) Untreated platelets (gray) vs NC (black) (B) Treated platelets (gray) vs NC (black)

รูปที่ 4 แสดงซีรัมของมารดาทำปฏิกิริยากับ autologous platelets (A) untreated autologous platelets (MFI =4.87%) และ(B) chloroquine treated autologous platelets (MFI =6.38%) เปรียบเทียบกับ negative control (NC)

ตารางที่ 3 แสดงผล complete blood count ของผู้ป่วยที่เป็น NAIT

Age (day)	Hb g/dL	Hct %	White cells /mm^3	Pletelet /mm^3	PMN %	Lymph %	Eo %	Mono %	Baso %	Band %	Meta %	Myelo %
3	14.3	40.3	9,500	11,000	42	45	4	6	1	-	1	1
Post platelet transfusion				180,000								
20	13.2	33	13,200	7,000	15	70	4	4	2	5	-	-
21	14.7	43	9,200	11,000	49	44	2	4	1	-	-	-
22	14.5	42	9,000	32,000	60	32	2	5	1	-	-	-

ตรวจแยกชนิด platelet alloantibodies โดยวิธี adsorb HPA antibody ออกด้วย chloroquine treated platelets หลังจากนั้นตรวจซ้ำด้วย untreated platelets และ chloroquine treated platelets ของบิดา ผลการตรวจไม่พบ platelet alloantibody เหลืออยู่แสดงว่า platelet alloantibody เป็นชนิด HPA antibody อย่างเดียวและไม่มี HLA antibody (รูปที่ 3) ผลการตรวจยืนยัน HLA antibody โดยเทคนิค lymphocytotoxicity ระหว่างซีรัมมารดากับ mononuclear cells panel จากผู้บริจาคเลือดชุดเดียวกับ platelets panel ซึ่งได้ผล HLA antibody negative (ไม่ได้แสดงรายละเอียด) ผลตรวจ platelet autoantibody ในมารดาพบว่า negative (รูปที่ 4) ทารกจึงได้รับการวินิจฉัยเป็น neonatal alloimmune thrombocytopenia

วิจารณ์

จากผลการศึกษาผู้ป่วยย้อนหลัง 4 ปี ที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบทารกที่มี NAIT 1 รายจากการส่งตรวจทั้งหมด 9 ราย และในช่วงเวลาที่ศึกษามีทารกที่คลอดมีชีวิต 11,529 ราย คิดเป็นอัตราการเกิด NAIT ในทารกชาวไทยในภาคใต้ประมาณ 1:11,529 ต่อการคลอดมีชีวิต (ร้อยละ 0.009) การศึกษา NAIT ในทารกชาวไอริชที่มี thrombocytopenia และได้ส่งตรวจหา NAIT ก็พบอัตราการเกิดประมาณ 1:16,500 ต่อการคลอดมีชีวิต[3] การศึกษาที่เป็น National Surveillance ในหญิงตั้งครรภ์ในประเทศสหราชอาณาจักรในช่วงปี ค.ศ. 2006-2008 รายงานการเกิด NAIT ในโรงพยาบาลทั่วประเทศโดยมี adjusted incidence 1.2 :10,000 ของการคลอดมีชีวิต[22] จะเห็นว่าทั้งสองการศึกษานี้มีอัตราการเกิด NAIT ใกล้เคียงกับที่พบในการศึกษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และค่าที่ได้พบว่าต่ำกว่าอุบัติการณ์ที่ได้จากการศึกษาโดยการตรวจคัดกรองแอนติบอดีในหญิงตั้งครรภ์ชาวคอเคเชียนที่พบประมาณ 1:1,000-1:2,000 ของการคลอดมีชีวิตและแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจาก anti-HPA-1a[1-2,23-24,26] อุบัติการณ์ที่พบแตกต่างนี้อาจอธิบายได้ว่าขึ้นกับวิธีการศึกษาเพราะทารกที่ส่งตรวจ NAIT มักเป็นทารกที่มีอาการและมี thrombocytopenia ชัดเจนหรืออาจเรียกว่า clinically detected NAIT ส่วนการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์ที่พบอุบัติการณ์สูงถึง 1:1,000-1:2,000 เป็น prospective study ที่ตรวจ platelet antibody screening ในหญิงตั้งครรภ์และอาจเป็นไปได้ว่ามารดาที่มี platelet antibody และทารกอาจไม่ได้ส่งตรวจทุกรายเช่นทารกที่ไม่มีอาการ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการตรวจพบและการวินิจฉัยในประชากรไทยมีความเป็นไปได้ที่จะต่ำกว่าความเป็นจริงซึ่งเกิดจากหลายปัจจัยเช่น แพทย์อาจไม่คำนึงถึงการเกิด NAIT ในทารกเพราะเป็นภาวะที่ไม่พบบ่อยจึงอาจไม่ส่งตรวจ และสาเหตุของเกล็ดเลือดต่ำในทารกแรกคลอดมีได้หลายสาเหตุที่อาจพบได้บ่อยกว่า NAIT เช่น sepsis, congenital infections, hypoxia secondary to perinatal asphyxia or aspiration, congenital genetic syndrome, congenital leukemia, cyanotic congenital heart disease, maternal preeclampsia, maternal drug ingestion[27] ปัจจัยอื่นเช่นมีห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจมีจำนวนจำกัดในประเทศไทยและเทคนิคการตรวจอาจไม่ไวพอโดยเฉพาะในการวินิจฉัยในรายที่มารดามีระดับแอนติบอดีต่ำมาก เช่นเทคนิค SPRCA[28-29] หรือแม้แต่เทคนิค flow cytometry ที่ใช้ในการศึกษานี้อาจมีความไวสูงแต่ไม่ใช่เทคนิคที่ไวที่สุดในการตรวจหา platelet antibody ถึงแม้จะมีการศึกษาสนับสนุนว่า flow cytometry มีความไวใกล้เคียงกับเทคนิคมาตรฐานวิธี MAIPA[19] อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่แสดงการใช้เทคนิคมาตรฐาน MAIPA ที่มีความไวสูงในการตรวจวินิจฉัย NAIT ก็สามารถทำให้เกิดผลลบลวงได้ เพราะเมื่อใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นใหม่เช่นเทคนิค surface plasmon resonance technology ในการตรวจ NAIT ปรากฏว่าได้ผล platelet antibody positive ในขณะที่ MAIPA ให้ผล negative[30]

ในการศึกษานี้พบว่า flow cytometry ตรวจพบผู้ป่วย NAIT ได้มากกว่า SPRCA ข้อดีของการใช้ flow cytometry คือวิธีการอ่านผลจะใช้การวิเคราะห์จากเครื่องมือซึ่งได้มาตรฐานดีกว่า SPRCA ซึ่งอ่านด้วยตามนุษย์อาจทำให้ผลไม่แม่นยำได้ถ้าระดับแอนติบอดีไม่สูงมาก โรงพยาบาลสงขลานครินทร์เพิ่งเริ่มให้บริการตรวจ platelet alloantibody ด้วยเทคนิค SPRCA เมื่อปี พ.ศ. 25450-2551 และเริ่มตรวจด้วยเทคนิค flow cytometry ปี พ.ศ. 2552 ในทารกที่เป็น NAIT รายนี้ผลการทดสอบสนับสนุนว่าผู้ป่วยเกิดภาวะนี้จาก HPA alloantibody ของมารดาอย่างเดียวไม่มี HLA antibody ร่วมด้วยเพราะผลตรวจ lymphocytotoxicity และ adsorbed anti-HPA serum ให้ผล HLA antibody เป็นลบ นอกจากนี้ได้ทดลองทำการทดสอบพบว่า ABO incompatibility ระหว่างหมู่เลือดของบิดาและมารดาไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับการทดสอบหา HPA และ HLA antibodies (ไม่ได้แสดงรายละเอียด) การจำแนกชนิดของ HPA alloantibody ในทารกที่มีแอนติบอดีรายนี้ก็มีข้อจำกัดเพราะไม่มี known HPA platelets panel ในการตรวจแยก ส่วนการตรวจหาหมู่เกล็ดเลือด HPA ในบิดาและมารดาซึ่งมีประโยชน์แต่ไม่สามารถทำได้เพราะติดตามตัวมาเจาะเลือดอีกไม่ได้ อย่างไรก็ตามชนิดของแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุและความถี่ของการเกิด NAIT ในประชากรไทยอาจต่างจากชาวคอเคเชียนเพราะความถี่ของ HPA genotype มีความแตกต่างกัน Anti-HPA-1a เป็นสาเหตุของ NAIT ที่พบบ่อยในชาวคอเคเชียน

เมื่อพิจารณาจาก HPA gene frequency ในประชากรไทยโดยศึกษาในคนไทยภาคกลาง 500 ราย[25] และคนไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 300 ราย[31] พบว่า HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6 ในคนไทยทั้งสองภาคมีความใกล้เคียงกัน โดยพบ HPA-1b1b ในประชากรไทยเป็นศูนย์ (หรืออาจจะพบได้ต่ำมากถ้าจำนวนประชากรที่ศึกษามากขึ้น) บ่งชี้ว่าการเกิด NAIT จาก anti-HPA-1a ไม่น่าจะมีหรือถ้ามีก็น่าจะต่ำกว่าที่พบในชาวคอเคเชียน เมื่อพิจารณา HPA gene frequencyในประชากรญี่ปุ่น[32] เกาหลี[33] เวียดนาม[34] พบว่ามีความใกล้เคียงกับคนไทยภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งอาจจะพอสรุปคร่าวๆ ว่า HPA gene frequency ในประชากรมองโกลอยด์ส่วนใหญ่น่าจะมีความใกล้เคียงกัน ส่วนประชากรไทยภาคใต้น่าจะมี HPA gene frequency ใกล้เคียงกับคนไทยภาคอื่นเช่นกัน เมื่อพิจารณาหมู่ HPA ที่น่าจะเป็นปัญหาในประชากรไทยคาดว่า HPA-3 น่าจะเป็นไปได้สูงเพราะมี HPA-3a และ HPA-3b homozygousได้สูงทั้ง 2 genotypes และมีโอกาสจะได้รับ alloimunisation จากการตั้งครรภ์หรือการให้ blood transfusion ได้ง่าย (HPA-3a3a พบร้อยละ 30.4, HPA-3a3b พบร้อยละ 51.2 และ HPA-3b3b พบร้อยละ 18.4 HPA-3a gene frequency = 0.56, HPA-3b gene frequency = 0.44 ในการศึกษาในคนไทยภาคกลาง 500 ราย)[25] โอกาสที่มารดาเป็น homozygous HPA-3a จะตั้งครรภ์บุตรที่มีหมู่ HPA-3b มีความถี่เป็น 0.30 x 0.44 = 0.132 หรือร้อยละ 13.2 หรือมารดามีหมู่ homozygous HPA-3b จะตั้งครรภ์บุตรที่มีหมู่ HPA-3a จะมีโอกาสพบ 0.18 x 0.56 = 0.10 หรือร้อยละ 10 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตามความน่าจะเป็นก็อาจไม่สอดคล้องกับผลการตรวจทางคลินิกที่พบเพราะไม่ค่อยพบทารกที่มี neonatal thrombocytopenia ในประชากรคอเคเชียนมี gene frequency ของ HPA-3a ร้อยละ 47-68 และ HPA-3b ร้อยละ 31-52 ซึ่งแนวโน้มของ gene frequency เป็นแบบเดียวกับประชากรไทย แต่ไม่ค่อยพบมีรายงานปัญหาของ NAIT ที่เกิดจาก anti-HPA-3 ในประชากรคอเคเชียนมากนัก[35] นอกจากนี้ anti-HPA-5b และ -2b อาจจะมีบทบาทในการเกิด NAIT ในประชากรไทยได้เพราะจากการศึกษาของ Kupatawintu และคณะ[17] ซึ่งศึกษาในผู้ป่วยชาวไทยที่มี thrombocytopenia ส่วนใหญ่พบเป็น anti-HPA-5b และ -2b

ในครอบครัวที่มีประวัติทารกคลอดออกมาและมี platelet count <50,000 /ลบ.มม. ควรจะได้รับการสืบค้นหาสาเหตุโดยการตรวจกรองซีรัมมารดาหา platelet specific antibody (HPA antibody) และ platelet non specific antibody เช่น HLA antibody ที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือดของบิดา หรือตรวจหาชนิดของหมู่เกล็ดเลือดของทั้งบิดาและมารดา[10,36] ซึ่งการตรวจนี้ค่อนข้างจะจำกัดในประเทศไทยเพราะมีห้องปฏิบัติการไม่กี่แห่งที่ตรวจได้ (ปัจจุบันหน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ได้เปิดบริการเฉพาะการตรวจกรองหา platelet antibody แต่ยังไม่เปิดบริการตรวจหมู่เกล็ดเลือด HPA) ในมารดาที่ต้องการตั้งครรภ์อีกหลังจากคลอดทารกที่เป็น NAIT การตรวจหมู่เกล็ดเลือดของบิดาจะมีประโยชน์ในการพยากรณ์การเกิด NAIT ในทารกในครรภ์ต่อไป อย่างไรก็ตามในทารกที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิด NAIT เช่นมารดาเคยตั้งครรภ์ทารกที่เป็น NAIT และมารดามีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดของบิดา การตรวจติดตาม platelet count ของทารกในครรภ์ก็มีประโยชน์โดยอาจจำเป็นต้องทำ cordocentesis ตั้งแต่อายุครรภ์ 20 สัปดาห์ขึ้นไปและควรต้องเตรียมเกล็ดเลือดให้พร้อมที่จะให้ทารกในครรภ์ (intrauterine platelet transfusion) เพราะทารกอาจมีเลือดออกจากภาวะ thrombocytopenia การรักษาอื่นเช่นอาจพิจารณาให้ IVIG แก่มารดาร่วมด้วย

การเตรียมเกล็ดเลือดให้แก่ทารกในครรภ์[37] อาจเตรียมจากเกล็ดเลือดของมารดาและมารดาควรผ่านการตรวจเชื้อต่างๆ ที่อาจถ่ายทอดทางการให้เลือด หรืออาจเตรียมจากเกล็ดเลือดผู้บริจาคทั่วไปซึ่งมีหมู่เกล็ดเลือดไม่ตรงกับแอนติบอดีที่พบในมารดาและควรเลือกเกล็ดเลือดที่มีพลาสมาเข้าได้กับเม็ดเลือดแดงของทารก ควรเป็น irradiated platelet concentrate, CMV reduced risk หรือ leucocyte depleted platelet concentrate

การดูแลหลังคลอดในทารกที่มี NAIT โดยในระยะหลังคลอดทารกจะยังมี thrombocytopenia และมีความเสี่ยงที่จะเกิดภาวะเลือดออกสูงควรให้การรักษาเช่น การให้ prophylaxis compatible platelet transfusion แก่ทารกแต่ถ้าหา compatible platelet ไม่ได้ก็อาจพิจารณาให้ high dose IVIG แทน ซึ่งถ้าการรักษาได้ผลเกล็ดเลือดจะขึ้นเองภายใน 24-48 ชั่วโมง แต่ถ้าทารกมีภาวะเลือดออกและอยู่ในภาวะเร่งด่วนการให้เกล็ดเลือดทั่วไป (random platelet) ก็สามารถให้ได้เช่นกันโดยร่วมกับการให้ IVIG ซึ่งจะทำให้เกล็ดเลือดของทารกเพิ่มเองได้เร็วขึ้น[38]

สรุป

ความชุกของ clinically detected neonatal alloimmune thrombocytopenia ในทารกชาวไทยในภาคใต้พบ 1:11,529 ของการคลอดมีชีวิต ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในการศึกษาอื่นในสหราชอาณาจักร การตรวจวินิจฉัยและการรักษา NAIT ค่อนข้างซับซ้อน ควรเลือกใช้เทคนิคที่มีความไวสูงในการตรวจวินิจฉัยเช่น flow cytometry หรือ MAIPA อัตราการเกิด NAIT ที่พบต่ำมาก

อาจมีผลจากการที่แพทย์ไม่ได้คำนึงถึงหรือวินิจฉัยได้ต่ำกว่าความเป็นจริง การรักษาก็ค่อนข้างซับซ้อนแต่ถ้าวินิจฉัยได้เร็วก็อาจช่วยชีวิตทารกตั้งแต่อยู่ในครรภ์ได้ การประสานงานระหว่างสูติแพทย์ กุมารแพทย์ แพทย์โลหิตวิทยาและแพทย์เวชศาสตร์บริการโลหิต จะทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและเตรียมเกล็ดเลือดให้พร้อมแก่ทารกล่วงหน้าได้และจะช่วยลดอัตราพิการและเสียชีวิตในทารกที่มี NAIT

เอกสารอ้างอิง

1. *Mandelbaum M, Koren D, Eichelberger B, Auerbach L, Panzer S. Frequencies of maternal platelet alloantibodies and autoantibodies in suspected fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, with emphasis on human platelet antigen-15 alloimmunization. Vox Sang 2005;89:39-43.*
2. *Davoren A, Curtis BR, Aster RH, Mc Farland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion 2004;44:1220-5.*
3. *Davoren A, McParland P, Barnes CA, Murphy WG. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: a discrepancy between observed and expected cases. J Clin Pathol 2002;55:289-92.*
4. *Bussel JB, Primiani A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. Blood Rev 2008;1:33-52.*
5. *Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E. Frequency of immune thrombocytopenia in new borns : a prospective study. Blood 1997;89:4402-6.*
6. *Mueller-Eckhard C, Kiefel V, Grubert A. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. Lancet 1989;1:363-6.*
7. *Burrows RF, Kelton JG. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. N Engl J Med 1993;329:1463-6.*
8. *Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P. Antenatal screening for fetal alloimmune thrombocytopenia: the results of a pilot study. Br J Haematol 1995;90:321-5.*
9. *Kaplan C. Alloimmune thrombocytopenia of the fetus and the new born. Blood Rev 2003;16:69-72.*
10. *Bussel JB, Sola-Visner M. Current approaches to the evaluation and management of the fetus and neonate with immune thrombocytopenia. Semin Perinatol 2009;33:35-42.*
11. *Williamson LM, Hackett G, Rennie J. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (Pl^{A1}, Zw^{a}) as determined by antenatal screening. Blood 1998;92:2280-7.*
12. *Kjelden-Kragh J, Killie MK, Tomter G, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood 2007;110:833-9.*
13. *Levin M, de Veld JC, van der Holt B, van't Veer MB. Screening for alloantibodies in the serum of patients recieving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. Transfusion 2003;43:72-7.*
14. *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.*
15. *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.*
16. *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.*
17. *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.*
18. *Lown J, Ivey J. Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. Transfus Med 1991;1:163-7.*
19. *Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. Transfusion 2001;41:766-70.*
20. *Kohler M, Dittmann J, Legler TJ, et al. Flow cytometric detection of platelet-reactive antibodies and application in platelet crossmatching. Transfusion 1996;36:250-5.*
21. *Garvey M, Blanchchette V. Antiplatelet antibody detection in alloimmunized patients with acute leukemia. Transfus Sci 1996;17:295-302.*
22. *http://www.wellbeingofwomen.org.uk/researh/:cited 25 May 2010.*
23. *Tiller H, Killie MK, Spogen B, Oian P, Husebekk A. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: poor detection rate with nonscreening versus a general screening programme. BJOG 2009;116:594-8.*
24. *Ahya R, Turner ML, Urbaniak SJ. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. Transfus Apher Sci 2001;25:139-45.*
25. *Kupatawintu P, Nathalang O, O-Charoen, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. Immunohematology 2005;21:5-9.*
26. *Murphy MF, Bussel JB. Advances in the management of alloimmune thrombocytopenia. Br J Haematol 2007;136;366-78.*
27. *Millar L. Immune Thrombocytopenia and Pregnancy. http://emedicine.medscape.com/article/208697, update Nov 2009:cited 17 May 2010.*
28. *Freedman J, Wright J, Hornstein A, et al. Antiplatelet antibody detection in alloimmunized patients with acute leukemia. Transfus Sci 1996;17:295-302.*
29. *Kataoka S, Kobayashi H, Chiba K, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to an antibody against a labile component of human platelet antigen-3b (Bak^{b}). Transfus Med 2004;14:419-23.*
30. *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.

31. *Romphruk AV, Akahat J, Srivanicharak P, Puapairoj C, Romphruk A, Leelayuwat C. Genotyping of human platelet antigens in ethic Northeastern Thais by the polymerase chain reaction-sequence specific primer technique. J Med Assoc Thai 2000;83:1333-7.*
32. *Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. Transfusion 1996;36:813-7.*
33. *Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American , white, and Korean populations. Transfusion 1995;35:863-7.*
34. *Halle L, Bach K H, Martageix C, et al. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. Tissue Antigens 2004:63:34-40.*
35. *Ferrer G, Muniz-Diaz E, Aluja MP. Analysis of human platelet antigen system in a Moroccan Berber population. Transfus Med 2002;12:49-54.*
36. *Arnold DM, Smitha JW, Keltona JG. Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. Transfus Med Rev 2008;22:255-67.*
37. *Robert I. Prenatal and childhood transfusions. In: Murphy MF, Pamphilon DH (eds). Practical Transfusion Medicine, 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:97-118.*
38. *Bussel JB, Zabusky MR, Berkowitz RL, McFarland JG. Fetal alloimmune thrombocytopenia. N Engl J Med 1997;337:22-6.*

Prevalence and Diagnosis of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia using Flow Cytometry

Charuporn Promwong and Jarin Buakaew

Blood Bank and Transfusion Medicine, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla , Thailand

---

Abstract : *Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) is a disorder in which the fetus or newborn has thrombocytopenia caused by maternal alloimmunisation against the newborn's platelet antigens. The newborn usually had platelet antigens inherited from the father and were not present in the mother's platelet particularly the HPA system. The prevalence of NAIT in Southern Thailand and techniques to detect platelet alloantibodies were investigated. The data records of NAIT investigation were retrospectively studied during the past 4 year in Songklanagarind Hospital. The techniques used were solid phase red cell adherent assay (SPRCA) and flow cytometry. The results showed NAIT was detected in 1 out of 9 infants who were investigated. The prevalence of NAIT in Thai infants in our hospital was 1:11,529 (0.009%) of live births and flow cytometry detected more case of NAIT than that of SPRCA. Prevalence of NAIT in this study was clinically detected and consistent with other studies in British and Irish infants. Complications of NAIT vary from mild symptoms to severe intracranial hemorrhage therefore a rapid diagnosis with high sensitivity testing and early management would reduce the morbidity and mortality rate of a fetus/newborn affected with this condition.*

Key Words : ● *Neonatal alloimmune thrombocytopenia* ● *SPRCA* ● *Flow cytometry* ● *Prevalence*

J Hematol Transfus Med 2010;20:179-89.