

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความสำคัญของการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธีโพลีไฮโดเมทรีซีก่อนผ่าตัดปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต ณ โรงพยาบาลศิริราช

ปาริชาติ เพิ่มพิกุล กฤษดา โคกตาทอง ยุบลรัตน์ ธนเขตไพศาล วิจิตชัย บิณฑาประสิทธิ์

สุทธิศักดิ์ แจ่มใส โกมล หลวงตระกูล และ ศศิจิต เวชแพศย์

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ Flow cytometry lymphocyte crossmatch (FCXM) เป็นวิธีที่มีความไวสูงสุดวิธีหนึ่งในการตรวจ donor specific antibody (DSA) ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี โรงพยาบาลศิริราชได้นำ FCXM มาตรวจความเข้ากันได้ระหว่างผู้บริจาคไตที่มีชีวิตกับผู้ป่วย (living related kidney transplantation, LRKT) ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2544 และคณะผู้ศึกษารายงานผลการตรวจ FCXM ในครั้งแรกและการตรวจซ้ำ ภายใน 72 ชั่วโมงก่อนการปลูกถ่ายไต ที่มีการขอตรวจในระหว่างปี พ.ศ. 2550-2556

วัสดุและวิธีการ ทำการรวบรวมข้อมูลย้อนหลังใน LRKT ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 ประกอบด้วยข้อมูลทั่วไป อายุ เพศ หมู่เลือด จำนวนความแตกต่างของ HLA ระหว่างผู้ป่วยกับ ผู้บริจาคไต รวมทั้งระยะเวลาระหว่างการตรวจครั้งแรกและการตรวจซ้ำ

ผลการศึกษา ในระหว่างปี พ.ศ. 2550-2556 มีการขอตรวจ LRKT จำนวน 388 ราย และ ขอทำ FCXM จำนวน 216 ราย ผลการตรวจ FCXM ทั้งสองครั้งเป็นลบจำนวน 199 ราย (92.1%) และมีจำนวน 17 ราย (7.9%) ที่ FCXM ให้ผลแตกต่างกันคือ FCXM ให้ผลลบในครั้งแรกแต่ให้ผลบวกในครั้งหลังกับ T cells และ B cells อย่างละ 3 ราย FCXM ให้ผลบวก กับ T cells และ B cells ในครั้งแรกแต่ให้ผลลบในครั้งหลังจำนวน 3 ราย และ 7 ราย ตามลำดับ และมีอีก 1 รายที่ B cells FCXM ให้ผลบวกทั้งสองครั้ง

สรุป การศึกษาเป็นการรายงานผล FCXM ของการทำ LRKT เป็นครั้งแรกของประเทศไทย ซึ่งพบว่าผู้ป่วยหลายรายที่การตรวจ FCXM ซีก่อนผ่าตัดปลูกถ่ายไต ที่เคยมีผลลบกลับมีผลบวก จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความสำคัญทางคลินิกต่อไป

Keywords : ● Flow cytometry crossmatch ● Living related kidney transplantation ● Thailand

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557;24:111-8.

บทนำ

การปลูกถ่ายไตเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ให้ผลดีที่สุด เพราะจะทำให้ผู้ป่วยกลับมามีไตที่สามารถทำหน้าที่อย่างมีประสิทธิภาพส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นสามารถใช้ชีวิตประจำวันได้เหมือนคนปกติ ในระยะเริ่มแรกของการปลูกถ่ายไตทำโดยใช้ไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต (deceased donor) แต่เนื่องจากประสพปัญหาในการจัดหาไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตมีไม่เพียงพอกับจำนวนผู้ป่วยที่รอรับการปลูกถ่ายไต ถึงแม้จะมีการขยายกฎเกณฑ์การรับอวัยวะให้กว้างขวางขึ้น เช่น จากผู้สูงอายุหรือกรณีหัวใจหยุดเต้นแล้ว ปริมาณของไตที่ได้รับก็ยัง

ไม่เพียงพอ¹ การรับบริจาคไตจากผู้ที่มีชีวิตจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะจัดหาไตมาเพื่อการปลูกถ่ายซึ่งสามารถนำมาจากญาติสายตรง (living related donors) หรือจากคู่สมรส (living non-related donors) ที่มีหลักฐานการจดทะเบียนสมรสจนถึงวันผ่าตัดปลูกถ่ายไตไม่น้อยกว่า 3 ปี ตามข้อบังคับแพทยสภา พ.ศ. 2553² ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ได้ไตที่มีคุณภาพดีเพราะมาจากร่างกายผู้ที่ปกติ ไม่มีภาวะขาดเลือด ส่งผลให้การปลูกถ่ายไตได้ผลดียิ่งขึ้น ในปัจจุบันการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตจึงเป็นทางเลือกแรก แต่หากไม่สามารถหาไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตได้จึงจะให้ผู้ป่วยไปลงทะเบียนเพื่อรอรับไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต ณ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย ในการปลูกถ่ายไตที่ประสบความสำเร็จต้องได้รับการสนับสนุนอย่างเข้มแข็งจากห้องปฏิบัติการตรวจทางเนื้อเยื่อหรือ human leukocyte antigen (HLA) ในระยะแรกที่ทำ การปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตนั้น การตรวจเนื้อเยื่อมี

ได้รับต้นฉบับ 7 พฤษภาคม 2557 รับลงตีพิมพ์ 26 พฤษภาคม 2557

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ ปาริชาติ เพิ่มพิกุล ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

E-mail: parichart.per@mahidol.ac.th

ความสำคัญอย่างยิ่งต้องมีคุณภาพที่ดีและได้ผลถูกต้องรวดเร็ว เพื่อแข่งกับเวลาที่ไตขาดเลือด (cold ischemic time) นอกจากนี้ความแตกต่าง (mismatch) ที่น้อยกว่าของ HLA ระหว่างเนื้อเยื่อของผู้ป่วยและผู้บริจาคจะทำให้การปลูกถ่ายไตนั้นได้ผลดีและไตสามารถใช้งานได้นานขึ้น การตรวจอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งคือการทำ lymphocyte crossmatch ระหว่างซีรัมของผู้รับและ lymphocyte ของผู้บริจาค ซึ่งหากเข้ากันไม่ได้แล้วจะทำให้การปลูกถ่ายไตได้ผลไม่ดีหรือมีภาวะต่อต้านเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (acute rejection) ซึ่งผลการตรวจนี้มีความสำคัญรองลงมาจาก การมีหมู่เลือด ABO ที่เหมือนกันหรือเข้ากันได้ระหว่างผู้ให้กับผู้รับไต ในระยะหลายสิบปีที่ผ่านมาการพัฒนาวิทยาการทางการแพทย์ทำให้มีการใช้ยากดภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยได้ดีมากขึ้น จึงสามารถตรวจพบภาวะ rejection ได้ในระยะเริ่มแรก ทำให้แพทย์สามารถให้การรักษาเพื่อรักษาไตไว้ได้ ดังนั้นการปลูกถ่ายไตจึงมีการทำมากขึ้น และสามารถทำได้แม้ว่าผู้ป่วยและผู้บริจาคจะมีเนื้อเยื่อ HLA ที่ไม่เหมือนกัน ดังเช่นการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตซึ่งเป็นสามัญกรยา แต่ขณะเดียวกันก็ต้องมีการควบคุมเพื่อป้องกันการซื้อขายอวัยวะด้วย³

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เริ่มทำการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีภาวะสมองตายเป็นรายแรกเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2516 และทำการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตเป็นรายแรกเมื่อวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522⁴ โดยในระยะเริ่มแรกการตรวจ HLA typing และการทำ lymphocyte crossmatch ใช้วิธีการตรวจทาง serology คือ complement dependent lymphocytotoxicity test (CDC) และใช้วิธีที่เพิ่มความไวโดยใช้ anti-human kappa light chain globulin (AHG) ในระยะหลายสิบปีการตรวจทาง HLA ได้มีการพัฒนาไปอย่างมากจากระยะเริ่มแรกที่ใช้วิธี CDC ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เทคนิคและความชำนาญสูง ใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพงและใช้เวลานาน ต่อมาได้พัฒนาเปลี่ยนมาเป็นการตรวจยีน ซึ่งสามารถทำได้รวดเร็ว แม่นยำและมีความละเอียดมากกว่า การนำเทคนิค flow cytometry มาใช้ในการทำ lymphocyte crossmatch ซึ่งภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลโดย ศาสตราจารย์เกียรติคุณ พญ.ทัศนีย์ นันท์นิงยัง ได้ให้นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิตทำการศึกษาดังแต่ปี พ.ศ. 2542⁵ และเมื่อพัฒนางานได้ผลดีจึงนำมาใช้ในการบริการเพื่อเสริมกับวิธี CDC และ AHG ตั้งแต่วันที่ 10 มกราคม พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา สำหรับการตรวจให้ผู้ป่วยที่รอเปลี่ยนไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิต โดยทั่วไปนั้นเมื่อแพทย์ขอตรวจ HLA ในผู้ป่วยและผู้บริจาคอวัยวะในครั้งแรกจะ

ทำ lymphocyte crossmatch ทั้งวิธี CDC, AHG และ flow cytometry พร้อมทั้งรายงานผลให้แพทย์ทราบเมื่อจะทำการปลูกถ่ายไต ซึ่งแต่ละรายมีการรอเป็นระยะเวลานานที่แตกต่างกันระหว่างการตรวจเนื้อเยื่อและการทำ lymphocyte crossmatch ตามมาตรฐานของ American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)⁶ ได้กำหนดให้มีการทำ re-crossmatch ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงก่อนทำการปลูกถ่ายไต ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่ามีความเข้ากันได้จริง เนื่องจากในระยะเวลาที่ผ่านมา หลังการตรวจครั้งแรกอาจมีการกระตุ้นให้สร้าง HLA antibody ในผู้ป่วยได้ เช่น การให้เลือด การได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น ในโรงพยาบาลศิริราชผู้ป่วยที่จะทำการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตจะได้รับ การตรวจ re-crossmatch ทุกราย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทำ flow cytometry lymphocyte crossmatch (FCXM) ในครั้งแรกกับการทำ FCXM ซ้ำก่อนผ่าตัด

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาโดยใช้วิธี retrospective laboratory record study ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตทุกรายที่ผู้บริจาคไตเป็นผู้ที่มีความสัมพันธ์กันโดยแพทย์ส่งตรวจ HLA typing และขอทำ re-crossmatch โดยใช้ FCXM ก่อนการผ่าตัดในระหว่างเดือน มกราคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) หมายเลข Si214/2014 โดยรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตได้แก่ เพศ อายุ ความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยกับผู้บริจาคไต หมู่เลือด ผลการตรวจ FCXM ในครั้งแรกและครั้งที่สอง ทั้ง T cells และ B cells จำนวนความแตกต่างของ HLA ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคไต และระยะเวลาระหว่างการทำ FCXM ในครั้งแรกและครั้งที่สอง

การตรวจ HLA typing ประกอบด้วย

1. HLA class I ใช้วิธี microlymphocytotoxicity fluorescence technique โดยใช้ DCH HLA-A,B typing tray ซึ่งผลิตโดย ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2. HLA class II ใช้เทคนิค polymerase chain reaction

- sequence specific primer (PCR-SSP) โดยใช้ชุดตรวจ SSP2L Micro SSP DRB/DQB generic ของบริษัท One Lambda จากประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3. Flow cytometry lymphocyte crossmatch ใช้เทคนิค two-color technique ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนจากวิธีการของ กฤษดา โคกตาทองและคณะได้รายงานไว้⁵

การทำ T-cell FCXM ทำโดยใช้ donor's T lymphocytes ทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วย incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง เติมน second antibody ซึ่งเป็น Phycoerythrin labeled anti-CD3 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) และ goat F(ab')₂ anti-human IgG-FITC antibody แล้วนำไป incubate ต่อในที่มีดที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วล้างด้วย PBS และหยุดปฏิกิริยาด้วย 1% formaldehyde หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

การทำ B-cell FCXM ใช้ donor's whole lymphocyte ทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วย incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งแล้วเติมน second antibody ซึ่งเป็น Phycoerythrin labeled anti-CD19 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) และ goat F(ab')₂ antihuman IgG-FITC antibody แล้วนำไป incubate ต่อในที่มีดที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วล้างด้วย PBS และหยุดปฏิกิริยาด้วย 1% formaldehyde หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

การวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยใช้ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ในการอธิบายกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาและใช้ Chi-square ในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่จำเป็นโดยใช้ซอฟต์แวร์คำนวณค่า P-values จาก <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/Default2.aspx>

ผลการศึกษา

จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังผู้ป่วยที่รอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตในโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งได้ตรวจเนื้อเยื่อและทดสอบความเข้ากันได้ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 ทั้งหมด 388 คู่ ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่กลับมาทำ FCXM ซ้ำจำนวน 216 คู่ (55.7%) พบว่าผลการตรวจ FCXM ทั้งสองครั้งเป็นลบจำนวน 199 ราย (92.1%) โดยผู้ป่วยเป็นเพศชายจำนวน 117 ราย (58.8%) และเพศหญิงจำนวน 82 ราย (41.2%) มีอายุเฉลี่ย 40 ปี และพบว่าเป็นหมู่เลือด B มากที่สุดจำนวน 80 ราย (40.2%) ในผู้บริจาคพบว่าเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย คือจำนวน 126 ราย (63.3%) และ 73 ราย (36.7%) ตามลำดับ มีอายุเฉลี่ย 36 ปี โดยเป็นหมู่เลือด O มากที่สุดจำนวน 108 ราย (54.3%) ส่วนผลการตรวจ FCXM ที่ให้ผลบวกจำนวน 17 ราย (7.9 %) ในผู้ป่วยเป็นเพศชายจำนวน 12 ราย (70.6%) และเพศหญิงจำนวน 5 ราย (29.4%) มีอายุเฉลี่ย 43 ปี และพบว่าเป็นหมู่เลือด O มากที่สุดจำนวน 8 ราย (47.1%) ในผู้บริจาคพบว่าเป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย คือจำนวน 11 ราย (64.7%) และ 6 ราย (35.3%) ตามลำดับ และมีอายุเฉลี่ย 34 ปี โดยเป็นหมู่เลือด O มากที่สุดจำนวน 11 ราย (64.7%) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Demographic data of living related kidney transplant

Type	1 st & 2 nd FCXM : Negative (N = 199)		1 st or 2 nd FCXM : Positive (N = 17)	
	Patients	Donors	Patients	Donors
Sex				
Male	117 (58.8%)	73 (36.7%)	12 (70.6%)	6 (35.3%)
Female	82 (41.2%)	126 (63.3%)	5 (29.4%)	11 (64.7%)
Age				
Range (years)	17 - 62	18 - 60	21 - 61	20 - 53
Mean (years)	40	36	43	34
Blood group				
O	63 (31.7%)	108 (54.3%)	8 (47.1%)	11 (64.7%)
A	36 (18.1%)	28 (14.1%)	5 (29.4%)	4 (23.5%)
B	80 (40.2%)	58 (29.1%)	3 (17.6%)	1 (5.9%)
AB	20 (10.0%)	5 (2.5%)	1 (5.9%)	1 (5.9%)

1st FCXM = first time flow cytometry crossmatch; 2nd FCXM = final flow cytometry crossmatch

ความแตกต่างของเพศ หมู่เลือด และความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยกับผู้บริจาคไต HLA mismatch และ ระยะเวลาห่างของการตรวจ FCXM ในครั้งแรกและครั้งที่สอง ดังแสดงใน Table 2 พบว่า กลุ่มที่ให้ผลเป็นลบทั้งสองครั้งเป็นเพศหญิงบริจาคให้ไตกับเพศชายมากที่สุด รองลงมาเป็นเพศหญิงให้ไตกับเพศหญิง คือจำนวน 80 ราย (40.2%) และจำนวน 46 ราย (23.1%) ตามลำดับ แต่ในกลุ่มที่ให้ผลบวกเป็นบางครั้ง เป็นเพศหญิงให้ไตกับเพศชายมากที่สุด จำนวน 8 ราย (47.1%) รองลงมาเป็นเพศชายให้ไตกับเพศชายจำนวน 4 ราย (23.5%) สำหรับหมู่เลือดทั้งสองกลุ่มส่วนใหญ่มี ABO identical จำนวน 137 ราย (68.6%) ในกลุ่มที่ให้ผลเป็นลบและจำนวน 14 ราย (82.3%) ในกลุ่มที่ให้ผลบวกเป็นบางครั้ง สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยกับผู้บริจาคไตพบว่า ในกลุ่มที่ให้ผลลบ FCXM ทั้งสองครั้งส่วนมากเป็นพี่น้องกัน จำนวน 93

ราย (46.7%) แต่ในกลุ่มที่ให้ผลบวก FCXM เป็นบางครั้ง ส่วนมากมีความสัมพันธ์เป็น พ่อ แม่ ลูก กัน จำนวน 8 ราย (47.1%) HLA mismatch ในกลุ่มที่ให้ผลลบ FCXM ส่วนมากมี HLA 3 mismatch จำนวน 58 ราย (29.2%) แต่ในกลุ่มที่ให้ผลบวก ส่วนมาก มี HLA 2 mismatch จำนวน 5 ราย (29.4%) ส่วน HLA 6 mismatch ในทั้งสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ผลลบ FCXM ทั้งสองครั้งและกลุ่มที่ผลบวก FCXM เป็นบางครั้ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือร้อยละ 5.5 และ 5.9 ตามลำดับ ระยะห่างของการตรวจ FCXM ในครั้งแรกและก่อนผ่าตัด ระหว่างกลุ่มที่ให้ผลลบทั้งสองครั้งและกลุ่มที่ผลบวกเป็นบางครั้ง มีจำนวนวันเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน คือ 188 และ 184 วันตามลำดับ ซึ่งทั้งสองตารางได้แยกกลุ่มที่ผลการทำ FCXM เป็นลบทั้งหมด และเป็นบวกในบางครั้ง จำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วย group I : FCXM T และ B cells

Table 2 Additional information of recipients and donors

	1 st & 2 nd FCXM = Negative (N = 199)	1 st or 2 nd FCXM = Positive (N = 17)	P-values*
1.Sex between donors and recipients			
Female to female	46 (23.1%)	3 (17.6%)	0.6053
Female to male	80 (40.2%)	8 (47.1%)	0.5807
Male to male	37 (18.6%)	4 (23.5%)	0.6183
Male to female	36 (18.1%)	2 (11.8%)	0.5108
2.ABO blood group			
Identical	137 (68.8%)	14 (82.3%)	0.2437
Compatible	62 (31.2%)	3 (17.7%)	0.2437
3.relationship			
Parent-offspring	57 (28.6%)	8 (47.1%)	0.1120
Sibling	93 (46.7%)	4 (23.5%)	0.0648
Relative-next kin	21 (10.6%)	3 (17.6%)	0.3716
Husband-wife	28 (14.1%)	2 (11.8%)	0.7918
4. HLA -A,- B,- DR mismatch			
0 mismatch	29 (14.6%)	2 (11.8%)	0.7512
1 mismatch	17 (8.5%)	2 (11.8%)	0.6252
2 mismatch	44 (22.1%)	5 (29.4%)	0.4902
3 mismatch	58 (29.2%)	3 (17.6%)	0.3120
4 mismatch	23 (11.6%)	1 (5.9%)	0.4747
5 mismatch	17 (8.5%)	3 (17.6%)	0.2138
6 mismatch	11 (5.5%)	1 (5.9%)	0.9511
5.Interval between 1st & 2nd FCXM (days)			
Minimum	28	54	
Maximum	699	609	
Mean	188	184	

1st FCXM = first time flow cytometry crossmatch; 2nd FCXM = final flow cytometry crossmatch

*P-values were calculated using chi-square test from the online calculator at <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/Default2.aspx>

Table 3 Result of FCXM for both T cells and B cells

	T cells		B cells		Pairs
	1 st	2 nd FCXM	1 st	2 nd FCXM	
Group I	-	-	-	-	199 (92.1%)
Group II	-	+	-	-	3 (1.4%)
Group III	-	-	-	+	3 (1.4%)
Group IV	+	-	-	-	3 (1.4%)
Group V	-	-	+	-	7 (3.2%)
Group VI	-	-	+	+	1 (0.5%)

1st FCXM = first time flow cytometry crossmatch; 2nd FCXM = final flow cytometry crossmatch

ให้ผลเป็นลบทั้งหมด จำนวน 199 ราย (92.1%) group II : FCXM T cells ให้ผลลบในครั้งแรก แต่ให้ผลบวก FCXM ในครั้งที่สอง และ B cells ให้ผลเป็นลบทั้งสองครั้ง จำนวน 3 ราย (1.4%) group III : T cells ให้ผล FCXM เป็นลบทั้งสองครั้ง ในขณะที่ B cells ให้ผล FCXM บวกเฉพาะครั้งที่สอง จำนวน 3 ราย (1.4%) group IV : ให้ผลบวก FCXM เฉพาะ T cells ในครั้งแรก ส่วน B cells ให้ผล FCXM เป็นลบทั้งสองครั้งจำนวน 3 ราย (1.4%) group V : FCXM T cells ให้ผลเป็นลบทั้งสองครั้ง ส่วน FCXM B cells ให้ผลบวกเฉพาะครั้งแรก จำนวน 7 ราย (3.2%) และ group VI : FCXM T cells ให้ผลเป็นลบ แต่ FCXM B cells ให้ผลบวกทั้งสองครั้ง จำนวน 1 ราย (0.5%) ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

เนื่องจากที่โรงพยาบาลศิริราชได้มีการผ่าตัดปลูกถ่ายไตมาเป็นเวลานานและเป็นห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี แห่งแรกในประเทศไทยที่ได้นำเทคนิค flow cytometry มาใช้ทำ lymphocyte crossmatch ร่วมกับวิธี CDC และ AHG ในงานบริการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 สำหรับการทำให้ re-crossmatch ก่อนทำการปลูกถ่ายไตนั้นได้ดำเนินการมานานเช่นเดียวกัน คณะผู้ศึกษาได้ทำการศึกษาย้อนหลังเฉพาะผลการตรวจในช่วง 6 ปีที่ผ่านมาเท่านั้นโดยเป็นผู้ป่วยที่แพทย์ขอตรวจ HLA เพื่อการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตที่มีชีวิต จำนวน 388 ราย และขอตรวจ FCXM re-crossmatch จำนวน 216 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.7 ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้เป็นผู้บริจาคที่มีชีวิตบริจาคไตและพร้อมทำการเปลี่ยนไตในช่วงเวลาดังกล่าว อายุของผู้ที่บริจาคไตโดยเฉลี่ยน้อยกว่าผู้ป่วยทั้งกลุ่มที่ FCXM ที่ให้ผลลบและกลุ่มที่มีผลบวก ผู้บริจาคไตเป็นหญิงมากกว่าชายอย่างชัดเจนในทั้งสองกลุ่ม สำหรับหมู่เลือด ผู้ป่วยกลุ่มที่ FCXM ให้ผลลบทั้งหมด มีการกระจายของหมู่เลือดผู้ป่วย

แตกต่างจากประชากรทั่วไปเล็กน้อย โดยที่หมู่ B พบมากที่สุดรองลงมาคือหมู่ O หมู่ A และ AB ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ให้ผลบวกในบางครั้ง ส่วนใหญ่ถึงร้อยละ 47 มีหมู่เลือด O รองลงมาคือ หมู่ A หมู่ B และ AB ตามลำดับ การที่การกระจายแตกต่างจากที่พบในคนทั่วไป อาจเพราะจำนวนที่น้อยในกลุ่มหลังเพียง 17 ราย เท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบเพศของผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่เหมือนกัน และแตกต่างกัน จากข้อมูลมีการกระจายในทำนองเดียวกันระหว่างกลุ่มที่ FCXM ให้ผลลบและผลบวก คือ เพศเดียวกันประมาณร้อยละ 41 และเพศที่ต่างกัน ประมาณร้อยละ 59 การเปรียบเทียบหมู่เลือด กลุ่มที่ให้ผลลบ มีอัตราหมู่เลือดที่เหมือนกันน้อยกว่า แต่หมู่เลือดที่เข้ากันได้มากกว่ากลุ่มที่ให้ผลบวกบางครั้ง สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างผู้บริจาคไตและผู้ป่วย ในกลุ่มที่ FCXM ให้ผลลบ ส่วนใหญ่ผู้บริจาคไตเป็นพี่น้อง ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลบวกผู้ที่บริจาคไตและผู้ป่วยเป็นแม่ลูกกัน ซึ่งอาจจะอธิบายได้จากการมีโอกาสร้อง sensitization จากกระบวนการในธรรมชาติสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ขณะที่การบริจาคไตระหว่างสามีภรรยา ไม่ได้มีความถี่มากขึ้นในกลุ่ม FCXM ให้ผลบวกเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ผลลบ จำนวน HLA ที่ แตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างกันใน 2 กลุ่มรวมทั้งระยะห่างระหว่างการทำให้ FCXM ในครั้งแรกและครั้งที่สองโดยเฉลี่ยก็มีค่าใกล้เคียงกันในทั้งสองกลุ่ม

ผู้บริจาคและผู้ป่วยที่เคยตรวจ FCXM ว่ามีผลลบ จำนวน 205 ราย ส่วนใหญ่ FCXM re-crossmatch ก็ให้ผลลบคือ 199 ราย (97.0%) แต่มีผู้ป่วยจำนวน 6 ราย ที่ FCXM เคยให้ผลลบ แต่การทำ FCXM re-crossmatch ให้ผลบวก โดยเป็นผลบวกของ T cells FCXM re-crossmatch จำนวน 3 ราย ซึ่งการตรวจพบดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่ง อาจต้องเปลี่ยนผู้บริจาคไต หรือปรับเปลี่ยนวิธีการกดภูมิคุ้มกันให้มากขึ้น ในขณะที่อีก 3 ราย B cells FCXM re-crossmatch ให้ผลบวกแต่ T cells FCXM re-crossmatch ให้ผลลบ อาจเกิดจาก antibody ที่ไม่จำเพาะ

ต่อ HLA antigen ได้ และไม่ถือว่าเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไต แต่แพทย์ต้องเพิ่มความระมัดระวัง เพราะมีความเสี่ยงต่อการเกิด rejection สูงกว่ารายที่ให้ผลลบ⁷ ผู้ป่วยที่เคยมีผล T cells FCXM หรือ B cells FCXM ให้ผลบวกในครั้งแรก และกลับมามีผลลบอาจเกิดจากการที่แพทย์ให้การรักษาเพื่อลดภาวะดังกล่าว การทำ FCXM re-crossmatch ได้บ่งบอกสภาพที่ antibody ได้ลดลงไปส่งผลให้ความเสี่ยงของการเกิด rejection น้อยลงและน่าจะส่งผลให้สามารถทำการปลูกถ่ายไตได้อย่างปลอดภัย

กรณีสุดท้ายที่พบว่า B cells FCXM ที่ให้ผลบวกยังคงเป็นบวกเมื่อทำ FCXM re-crossmatch เป็นกรณีบุตรบริจาคไตให้มารดาและเป็นผู้ป่วยที่โรงพยาบาลอื่นส่งมาตรวจที่โรงพยาบาลศิริราช ซึ่งมารดามี antibody ต่อ lymphocyte บุตร ซึ่งอาจไม่ใช่ส่วนของ HLA antigen แต่ก็มีเสี่ยงในการเกิด rejection มากกว่ารายที่ให้ผลลบ

การศึกษาจากประเทศอื่นๆ ในระยะแรกพบว่า ผลบวกของ T cells FCXM สัมพันธ์กับการลดลงของ graft survival และหากมีผลบวกของ B cells FCXM จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิด rejection ขึ้นได้ในภายหลัง^{7,8} การทำการปลูกถ่ายไต ผู้ป่วยที่มี current serum ให้ผลลบกับการตรวจ lymphocyte crossmatch ในขณะที่เคยมีประวัติผลบวก สามารถทำ kidney transplant ได้โดยไม่เกิด hyperacute rejection แต่ก็มี antibody mediated rejection ตามมาในระยะหลายเดือนต่อมา ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางวิทยาการการที่ lymphocyte crossmatch ให้ผลบวกยังมีทางออกที่ดีกว่าในอดีตมากมาย เพราะการรักษาที่ก้าวหน้าแม้ตรวจพบ rejection ก็ยังรักษาไตไว้ได้⁹

การศึกษาใน deceased kidney transplant พบว่า การตรวจหา DSA สามารถทำได้โดยหลายวิธี ได้แก่ CDC crossmatch ซึ่งมีความไวต่ำแต่มีความจำเพาะกับการเกิด rejection การใช้ FCXM สามารถตรวจหา DSA ได้ไวกว่า เพราะตรวจจับ IgG ได้ทุก subclass¹⁰ สำหรับ T cells มีการแสดงออกของ HLA class I antigen ในขณะที่ B cells มีทั้ง HLA class I และ class II โดยที่มีจำนวน class I antigen มากกว่า T lymphocyte ดังนั้นผู้ที่ FCXM ให้ผลบวกกับ T cells และ B cells จึงมี

ความสัมพันธ์กับการเกิด rejection มาก และเป็น true HLA antibodies และนอกจากความไวในด้านผลบวกแล้ว FCXM ที่ให้ผลลบ มี high negative predictive value สำหรับ antibody mediated rejection ด้วย¹¹

สรุป

การทำ FCXM crossmatch ในครั้งแรก เมื่อมีการตรวจเนื้อเยื่อเพื่อทำการปลูกถ่ายไต และในครั้งหลัง ที่ทำภายใน 72 ชั่วโมงก่อนทำการปลูกถ่ายไต เป็นวิธีการที่จะตรวจหา DSA ได้ดีที่สุดวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจและมี negative predictive value ที่สูง ทำให้แพทย์สามารถเลือกปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีความเหมาะสมและช่วยระบุผู้ป่วยในรายที่มีความเสี่ยงสูง เพื่อการดำเนินการเฉพาะเพื่อการรักษาที่ได้ผล ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลลัพธ์ทางคลินิกและข้อมูลที่สำคัญอย่างอื่น เช่น PRA ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลในการแปลผลที่สมบูรณ์ขึ้น การที่ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นที่แรกที่นำการตรวจ FCXM มาให้บริการ การศึกษานี้เป็นการรายงานผล FCXM ของการทำ LRKT เป็นครั้งแรกของประเทศไทย ซึ่งพบว่ามีผู้ป่วยหลายรายที่การตรวจ FCXM ซ้ำก่อนผ่าตัดปลูกถ่ายไต ที่เคยมีผลลบกลับมีผลบวก จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความสำคัญทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ พญ.ทัศนยานี จันทนียงยง ซึ่งเป็นผู้วางรากฐานงาน HLA เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยีและระดับยีน ได้แก่ นางกุสุมา อภัยเสวตร์ นางสาวสมพร งามถาวรวงศ์ นางดรุณี ไชยสงคราม นางสาวดวงพร ศรีนาค ช่วยรวบรวมข้อมูล นายสุทธิพล อุดมพันธ์รัก ที่ปรึกษาด้านสถิติ และ รองศาสตราจารย์ พญ.ศศิธร เพชรจันทร์ เป็นผู้ให้คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *Am J Kidney Dis* 2008;52:553-86.
2. Regulation of The Medical Council of Thailand for the ethical treatment of the medical professions, in Royal Thai Government Gazette 2010:106-7.
3. Sharif, A, Alachkar N, Kraus E. Incompatible kidney transplantation: a brief overview of the past, present and future. *QJM* 2012;105:1141-50.
4. Premasathian N, Vongwiwatana A, Taweemonkongsap T, et al. The 37-year kidney transplantation experience at Siriraj Hospital. *Clin Transpl* 2010:141-8.
5. Kottathong K, Vejbaesya S, Bejrachandra S, Pattanapanyasat K. Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *J Med Assoc Thai* 2005;88:769-74.
6. Hahn AB, Land GA, Strothman RM. *ASHI Laboratory manual*. 4th ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000.
7. Kotb M, Russell WC, Hathaway DK, Gaber LW, Gaber AO, et al. The use of positive B cell flow cytometry crossmatch in predicting rejection among renal transplant recipients. *Clin Transplant* 1999;13:83-9.
8. Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, et al. The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplant Proc* 2010;42:3471-4.
9. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-500.
10. Ayna, TK, Soyoz M, Kurtulmus Y, et al. Comparison of complement-dependent cytotoxic and flow-cytometry crossmatch results before cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc* 2013;45:878-80.
11. Lindemann M, Nyadu B, Heinemann FM, et al. High negative predictive value of an amplified flow cytometry crossmatch before living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010;71: 771-6.

Significance of Flow Cytometry Re-crossmatch in Living Related Kidney Transplantation at Siriraj Hospital

Parichart Permpikul, Krisada Koktathong, Yubolrat Thanaketpaisarn, Wichitchai Bintaprasit, Sutthisak Chamsai, Komon Luangtrakool and Sasijit Vejbaesya

Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract

Background: Flow cytometry lymphocyte crossmatch (FCXM) is one of the most sensitive method to detect donor specific antibody (DSA) in recipient of kidney transplantation. This method has been performed in every living related kidney transplantation (LRKT) at HLA laboratory Siriraj Hospital since January 2001. We report here the results of the first FCXM performed during HLA typing and the final re-crossmatch done within 72 hours prior to kidney transplantation.

Materials and Methods: We performed a retrospective review of laboratory record related to LRKT during January, 2007 to December, 2013. Demographic data, paired results of FCXM, ABO blood group of donors and recipients, number of HLA mismatch and interval in days between the two FCXM were retrieved.

Results: During the study period, a total of 388 patients were requested for HLA typing and FCXM for LRKT. Of these, 216 were requested to perform re-crossmatch FCXM. We found that the tests were negative both at the first and re-crossmatch FCXM in 199 (92.1%) patients. Seventeen cases (7.9 %) had positive FCXM results including three cases first negative and re-crossmatch positive T cells and another three cases with first negative and positive re-crossmatch B cell. Three cases were first positive and negative T cells re-crossmatch. Seven patients were first crossmatch positive and negative B cell re-crossmatch. In addition, one case had positive both first and re-crossmatch B cells FCXM.

Conclusion: This is the first report of performing routine FCXM for LRKT in Thailand. The results revealed that re-crossmatch FCXM is essential for kidney transplantation. However, the clinical data is needed to analyze the clinical relevance in this group.

Keywords : ● Flow cytometry crossmatch ● Living related kidney transplantation ● Thailand

J Hematol Transfus Med 2014;24:111-8.