

นิพนธ์ต้นฉบับ

อัตราการตรวจพบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด ณ โรงพยาบาลศิริราช

กุลสุมา อภัยเสวตร์ ดรุณี ไชยสงคราม สมพร งามถาวรวงศ์ เจนจิรา กิตติวรภัทร และ ปาริชาติ เพิ่มพิกุล

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

บทนำ ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหรือเกล็ดเลือดเป็นประจำ มีโอกาสเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่ไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion refractoriness; PTR) สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะนี้มีทั้ง non-immune และ immune คือ ผู้ป่วยถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี (alloimmunization) ต่อ class I human leukocyte antigens (HLA) หรือต่อ human platelet antigen (HPA) ห้องปฏิบัติการ HLA ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราช ได้ทำการตรวจคัดกรองและยืนยันภาวะ alloimmunization ในผู้ป่วยที่สงสัย PTR ด้วยวิธี lymphocytotoxicity test (LCT) และวิธี solid phase red cell adherence assay (SPRCA) ว่าปัญหาเกล็ดเลือดต่ำเกิดจากมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดหรือที่เรียกว่าภาวะ alloimmune platelet transfusion refractoriness

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอัตราการตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่ไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด และนำข้อมูลมาใช้บริหารจัดการการหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยกลุ่มนี้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ ศึกษาข้อมูลย้อนหลังจากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่มีภาวะ platelet transfusion refractoriness ที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการ HLA ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราช ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 554 ราย ด้วยวิธี LCT จำนวน 298 ราย และวิธี SPRCA จำนวน 256 ราย

ผลการศึกษา ในระหว่างปี พ.ศ. 2557-2562 มีการขอเกล็ดเลือดให้ผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราชทั้งหมด 16,464 ราย ในจำนวนนี้พบผู้ป่วยที่มีภาวะ PTR และขอส่งตรวจหาแอนติบอดีเพื่อยืนยันภาวะ alloimmunization จำนวน 554 ราย คิดเป็น 3.36% เมื่อนำมาศึกษาอัตราการตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วยกลุ่มนี้พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี LCT จำนวน 298 ราย ให้ผลบวก 134 ราย (44.97%) และตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี SPRCA จำนวน 256 ราย ให้ผลบวก 170 ราย (66.41%) เมื่อดูความสัมพันธ์ของผลการตรวจระหว่างวิธี LCT และวิธี SPRCA พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) รวมถึงให้ผล percent reactive antibody มากกว่าร้อยละ 70 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (34.33% และ 56.47% ตามลำดับ $p < 0.001$) นอกจากนี้พบว่า SPRCA มี turnaround time ที่สั้นกว่าวิธี LCT (2 และ 5 ชั่วโมง)

สรุป การตรวจด้วยวิธี LCT และวิธี SPRCA สามารถใช้ตรวจภาวะ PTR ที่มีสาเหตุจากแอนติบอดีได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีพบว่าอัตราการตรวจพบรวมถึงระดับความแรงของแอนติบอดีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย SPRCA สามารถตรวจพบได้อัตรามากกว่าและใช้เวลาที่น้อยกว่าวิธี LCT

คำสำคัญ : ภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด • วิธีลิมนโฟไซโตทอกซิกซิตี • โซลิดเฟสเรดเซลล์แอเดฮีเรนซ์แอสเซย์ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2565;32:211-7.

ได้รับต้นฉบับ 30 มิถุนายน 2565 แก้ไขบทความ 10 สิงหาคม 2565 รับลงตีพิมพ์ 23 สิงหาคม 2565

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ดร.ณัฏฐ์ ไชยสงคราม ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail: tondarunee@hotmail.com โทร 087-0190859

Original article

Prevalence of platelet reactive antibodies in patient's refractory to platelet transfusion at Siriraj Hospital

Kusuma Apisawes, Darunee Chaisongkram, Somporn Ngamthawonwong, Janejira Kittivorapart and

Parichart Permpikul

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

Abstract:

Introduction: Platelet transfusion refractoriness (PTR) is one of the major problems encountered in patients who frequently received blood and/or platelet transfusions. The PTR can result from both non-immune and immune causations. Alloimmunization to human leukocyte antigen (HLA) class I or human platelet antigen (HPA) is responsible for the later causation. Two techniques were applied to screen and confirm the immunization cause of the PTR in our HLA laboratory: lymphocytotoxicity test (LCT) and solid phase red cell adherence assay (SPRCA).

Objective: To study and compare frequencies of immunization PTR investigated in the HLA laboratory by LCT and SPRCA techniques. **Materials and Methods:** Data of 554 patients investigated for PTR in the HLA Laboratory at Siriraj hospital from January 2014 to December 2019 were retrospectively reviewed and analyzed. Of these, 298 and 256 patients were tested with the LCT and SPRCA techniques, respectively. **Results:** During 6-year period, there were 16,464 requests for PTR investigation. We found the platelet antibody in 554 patients (3.36%). The LCT was performed in 298 patients, and 134 (44.97%) had a positive result; while, SPRCA was performed in 256 patients, and 170 (66.41%) had positive results ($p < 0.001$). The percent reactive antibody $> 70\%$ was also statistically different between the two techniques. (34.33% vs 56.47%, $p < 0.001$). Moreover, SPRCA has a shorter turnaround time (2 vs. 5 hours) when compared to the LCT method. **Conclusion:** LCT and SPRCA techniques successfully identified the patients with immune cause PTR in our laboratory. However, SPRCA showed a more sensitive, shorter turnaround time and was less labor-intensive than the conventional LCT method.

Keywords : ● Platelet transfusion refractoriness ● Lymphocytotoxicity test
● Solid phase red cell adherence assay

J Hematol Transfus Med. 2022;32:211-7.

บทนำ

เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในกระบวนการห้ามเลือดของร่างกาย ทำหน้าที่หยุดเลือดออกเวลาเกิดบาดแผลหรือเกิดการบาดเจ็บต่อหลอดเลือด ผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดเลือดออกผิดปกติ การให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion) มีจุดประสงค์เพื่อรักษาเมื่อมีเลือดออกหรือเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงที่เกิดขึ้นเองเมื่อมีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ¹⁻³ ปัจจุบันแนวทางปฏิบัติทางการแพทย์ส่วนใหญ่แนะนำให้รักษาระดับเกล็ดเลือดให้มากกว่า 10,000 cells/ μ L เพื่อป้องกันการเกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรง (spontaneous serious hemorrhage)⁴ แม้ว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด โดยมีการเพิ่มขึ้นของเกล็ดเลือดอย่างเหมาะสม แต่มีผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่มีการตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดต่ำกว่าที่คาดไว้ตามเป้าหมาย หรือเกิดภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดที่เรียกว่า platelet transfusion refractoriness (PTR) โดยที่ผู้ป่วยเหล่านี้มีโอกาสเกิดภาวะเลือดออกแทรกซ้อนได้สูงโดยมีรายงานที่แสดงถึงการเกิดภาวะเลือดออกในผู้ป่วยที่มีภาวะ PTR สูงถึงร้อยละ 29.3 และส่งผลให้เกล็ดเลือดมีอายุสั้นลงเมื่อเทียบกับผู้ป่วยเกล็ดเลือดต่ำที่ไม่มีภาวะดังกล่าว⁵ นอกจากนี้ PTR มีผลกระทบต่อระยะเวลาในการอยู่โรงพยาบาลนานขึ้นและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาที่เพิ่มขึ้นถึง 2.5 เท่า⁶

ภาวะ PTR เกิดขึ้นเนื่องจากการทำลายเกล็ดเลือดของผู้บริจาคในร่างกายของผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดเร็วกว่าปกติ เมื่อมีการตรวจติดตามปริมาณเกล็ดเลือดหลังการให้เกล็ดเลือดแล้วนำมาคำนวณค่า correct count increment (CCI) หรือการตอบสนองต่อการได้รับเกล็ดเลือด โดย CCI หลังจากการให้เกล็ดเลือด 10 นาทีถึง 1 ชั่วโมง (1-hour CCI) มีค่าน้อยกว่า 7,500 cells/ μ L หรือ CCI หลังจากการให้เกล็ดเลือด 18-24 ชั่วโมง (24-hour CCI) มีค่าน้อยกว่า 4,500 cells/ μ L^{3,7,8} ซึ่งเกิดได้หลายสาเหตุทั้งจากกลไกทางภูมิคุ้มกันกล่าวคือ ผู้ป่วยมีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด (immune cause) และจากสาเหตุอื่นๆ (non-immune cause) ได้แก่ bone marrow transplantation ภาวะไข้ disseminated intravascular coagulation ม้ามโต และได้รับยาบางชนิด เช่น amphotericin เป็นต้น⁹ มีรายงานการศึกษาพบว่า 64 % ของผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำมีสาเหตุจากแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดหรือที่เรียกว่าภาวะ alloimmune PTR โดยแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ PTR นี้ มากกว่าร้อยละ 84 เป็นแอนติบอดีต่อ human leukocyte antigen (anti-HLA) เนื่องจากบนผิวเซลล์ของเกล็ดเลือดตรวจพบ HLA class I และแอนติเจน HLA มีความหลากหลายอย่างมาก อีกส่วนหนึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ human

platelet antigen (anti-HPA) ซึ่งเป็นแอนติเจนที่พบเฉพาะบนผิวของเกล็ดเลือดย่อยละ 3 และพบทั้ง anti-HLA ร่วมกับ anti-HPA ร้อยละ 13¹⁰ ภาวะ alloimmune PTR ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหรือเกล็ดเลือดมาแล้วหลายครั้งหรือพบในผู้ที่เคยตั้งครรภ์มาก่อน ในผู้ป่วยที่ตอบสนองไม่ดีต่อการได้รับเกล็ดเลือด โดยผู้ป่วยที่มีภาวะ alloimmune PTR จะพบว่าค่า CCI ที่ 10 นาทีถึงหนึ่งชั่วโมงมีค่าน้อยกว่า 7,500 cells/ μ L อย่างน้อย 2 ครั้ง ภายหลังการให้เกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือด ABO ตรงกันกับผู้ป่วยและขนาดที่ให้เหมาะสมกับน้ำหนักตัวของผู้ป่วยแล้ว^{9,11} การยืนยันการวินิจฉัยภาวะ alloimmune PTR ทำได้โดยการตรวจเลือดหา anti-HLA หรือ anti-HPA หรือทั้งสองชนิด วิธีการตรวจหาแอนติบอดีมีหลายวิธีขึ้นกับความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการในแต่ละโรงพยาบาล

สำหรับทางห้องปฏิบัติการ HLA โรงพยาบาลศิริราช ผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวะ alloimmune PTR คือคำนวณค่า 1-hour CCI พบว่าน้อยกว่า 7,500 cells/ μ L จะส่งตรวจเพื่อตรวจกรองและยืนยันโดยวิธี lymphocytotoxicity test (LCT) มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 และเปลี่ยนมาตรวจด้วยวิธี solid phase red cell adherence assay (SPRCA) ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 ถ้าตรวจพบปฏิกิริยาเป็นบวกต่อ random lymphocytes หรือเกล็ดเลือดถือว่าผู้ป่วยมีภาวะ alloimmune PTR เนื่องจากเดิมห้องปฏิบัติการ HLA โรงพยาบาลศิริราช ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาที่แสดงถึงอัตราการตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วยที่มีภาวะ alloimmune PTR และไม่มีข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างการตรวจทั้งสองวิธี โดยข้อมูลที่ได้นี้จะมีความสำคัญนำไปใช้บริหารจัดการเพื่อจัดหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสม เข้ากันได้ และปลอดภัยต่อการรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการตรวจพบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด และสงสัยว่ามีภาวะ alloimmune platelet transfusion refractoriness โดยเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่างวิธี LCT และวิธี SPRCA

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็น retrospective laboratory record study ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะเกล็ดเลือดต่ำและสงสัยว่ามี alloimmune PTR ที่ส่งตรวจหาแอนติบอดี ด้วยวิธี LCT ตั้งแต่ 1 มกราคม พ.ศ. 2557 ถึง 30 เมษายน พ.ศ. 2560 และตรวจด้วยวิธี SPRCA ตั้งแต่ 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ. 2562 โดยรวบรวมข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ หมู่เลือด การวินิจฉัยโรค ผลการตรวจแอนติบอดี และ

เปอร์เซ็นต์การตรวจพบปฏิกิริยาต่อ random donor lymphocytes โดยได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ Si 804/2020

วิธีการทดสอบ

Lymphocytotoxicity test (LCT)¹²

การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี LCT ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด ลิมโฟไซต์ (2×10^3 cells/ μ L) ที่แยกได้จากเลือดของผู้บริจาคเลือดทั่วไปโดยใช้หลักการ density gradient centrifugation ด้วยน้ำยา LymphoprepTM (Nycomed Pharma AS, Norway) อย่างน้อยจำนวน 24 ราย มาทดสอบกับซีรัมผู้ป่วย รวมทั้ง negative control serum ซึ่งได้มาจากซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศชาย หมู่เลือด AB ที่ไม่มีประวัติเคยได้รับเลือดมาก่อน (unsensitized donor) ที่ตรวจแล้วว่าไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ HLA และ positive control serum ที่ได้มาจากการรวมซีรัมของผู้ป่วยจำนวนอย่างน้อย 5 ราย ซึ่งมีผลแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA มากกว่าร้อยละ 80 โดยนำมาทำปฏิกิริยาใน Terasaki tray (Thermo Scientific, Denmark) ใช้ปริมาตรเซลล์และซีรัม อย่างละ 1 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วเติม rabbit complement (Niefenegger Company, USA) 5 μ L ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที แล้วย้อมสีด้วย eosin (Sigma, Germany) และหยุดปฏิกิริยาด้วย formaldehyde (Vidhyasom, Thailand) แล้วจึงนำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted phase contrast รุ่น Diaphot 200 (Nikon Corporation, Japan) โดยดูปฏิกิริยาของเซลล์ตายที่เกิดขึ้นและแปลผลปฏิกิริยาว่าให้ผลบวกเมื่อมีเซลล์ตายในแต่ละหลุมมากกว่าร้อยละ 21 ของจำนวนเซลล์ทั้งหมดในหลุมนั้น

Solid phase red cell adherence assay (SPRCA): Capture-P[®] solid phase technology^{13,14}

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดด้วยวิธี SPRCA โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Galileo Neo (Immucor Inc., USA) และใช้ microliter U plate Capture-P[®] test well (Immucor Inc., USA) ที่เคลือบด้วย anti-thrombocyte และชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งประกอบด้วย Capture LISS, Capture-P[®] indicator red cells และ Capture-P[®] negative/positive control serum (Immucor, Inc., USA) โดยทำตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด วิธีการตรวจโดยย่อ คือนำเลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็ง citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) ของผู้บริจาคเลือดทั่วไปอย่างน้อย 22 ราย มาเตรียมเป็น platelet rich plasma (PRP) ที่มีความเข้มข้นประมาณ 80,000-150,000 cells/ mm^3 แล้วนำไปใส่ในเครื่อง Galileo Neo จากนั้นเครื่องจะเติม PRP ลงใน

microliter U plate Capture-P[®] ให้มีลักษณะเป็น monolayer ที่ก้นหลุม จากนั้นเครื่องจะดูดซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยและน้ำยา Capture LISS ลงไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C แล้วจึงล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก แล้วเติม Capture-P[®] indicator red cells จากนั้นอ่านผลการทดสอบที่ความเร็วรอบ 600 xg นาน 2 นาที ถ้าในซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับ donor platelet antigen ที่เคลือบไว้ จะเห็นการแผ่ของ Capture-P[®] indicator red cells เติมหลุมแสดงว่าเป็นผลบวก แต่ถ้า Capture-P[®] indicator red cells ตกรวมกันเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมแสดงว่าเป็นผลลบ นั้นหมายถึงซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับ donor platelet antigen นั้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยใช้ค่าเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในการอธิบายกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และใช้ Z-test ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการตรวจระหว่างวิธี LCT และ SPRCA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$ โดยใช้ซอฟต์แวร์คำนวณค่า p-values จาก website <http://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default2.aspx>¹⁵

ผลการศึกษา

จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังผู้ป่วยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำและให้เกล็ดเลือดในระหว่างปี พ.ศ. 2557-2562 มีจำนวนทั้งหมด 16,464 ราย ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยซึ่งแพทย์สงสัยว่ามีภาวะ alloimmune PTR จากการตรวจติดตามปริมาณเกล็ดเลือดหลังการให้เกล็ดเลือดแล้ว นำมาคำนวณค่า CCI และพบว่าหลังจากการให้เกล็ดเลือด 10 นาที ถึง 1 ชั่วโมง มีค่า CCI น้อยกว่า 7,500 cells/ μ L หรือน้อยกว่า 4,500 cells/ μ L หลังจากการให้เกล็ดเลือด 18-24 ชั่วโมง^{3,7,8} และขอส่งตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดเพื่อตรวจหาภาวะ alloimmunization จำนวน 554 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.36 โดยเป็นเพศชายและเพศหญิงอย่างละ 277 ราย มีอายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) เท่ากับ 44.14 $\pm$ 24.30 ปี แบ่งเป็นผู้ป่วยหมู่เลือด O จำนวน 218 ราย หมู่เลือด A จำนวน 143 ราย หมู่เลือด B จำนวน 157 ราย และหมู่เลือด AB จำนวน 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.35, 25.81, 28.34 และ 6.50 ตามลำดับ และจำแนกผู้ป่วยตามการวินิจฉัยโรคได้ดังนี้ leukemia 182 ราย (32.85%) aplastic anemia 62 ราย (11.19%) lymphoma 61 ราย (11.01%) thalassemia 28 ราย (5.05%) myelodysplastic syndrome 15 ราย (2.71%) multiple myeloma 11 ราย (1.99%) agranulocytosis 9 ราย (1.62%) myeloproliferative diseases 6 ราย (1.08%) malignancy อื่นๆ 26 ราย (4.69%) และโรคหรือภาวะอื่น 154 ราย (27.80%) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Demographic data of patients who had platelet transfusion refractoriness (n = 554)

Type	Methods		Total
	LCT (n = 298)	SPRCA (n = 256)	
Sex			
Male	153	124	277 (50%)
Female	145	132	277 (50%)
Age			
Mean±SD	41.91±24.29	46.87±23.68	44.14±24.30
Blood group			
O	114	104	218 (39.35%)
A	79	64	143 (25.81%)
B	90	67	157 (28.34%)
AB	15	21	36 (6.50%)
Diagnosis			
Leukemia	94	88	182 (32.85%)
Aplastic anemia	34	28	62 (11.19%)
Lymphoma	30	31	61 (11.01%)
Thalassemia	22	6	28 (5.05%)
Myelodysplastic syndrome	7	8	15 (2.71%)
Multiple myeloma	4	7	11 (1.99%)
Agranulocytosis	5	4	9 (1.62%)
Myeloproliferative diseases	5	1	6 (1.08%)
Other malignancies	19	7	26 (4.69 %)
Other conditions	78	76	154 (27.80 %)

Table 2 Results of platelet antibodies detected by LCT and SPRCA

Results	n = 554	Methods		p-value
		LCT	SPRCA	
Negative	250(45.13%)	164 (55.03%)	86 (33.59%)	$p < 0.001^*$
Positive	304(54.87%)	134 (44.97%)	170 (66.41%)	$p < 0.001^*$

*statistically significant (p -values < 0.05)

LCT, lymphocytotoxicity test; SPRCA, solid phase red cell adherence assay

จากการศึกษาในผู้ป่วยทั้งหมด 554 ราย พบว่า การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดให้ผลบวกทั้งหมด 304 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.87 โดยแบ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี LCT จำนวน 298 ราย ให้ผลบวก 134 ราย คิดเป็นร้อยละ 44.97 ให้ผลลบ 164 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.03 สำหรับการตรวจด้วยวิธี SPRCA ในผู้ป่วย 256 ราย ให้ผลบวก 170 ราย ให้ผลลบ 86 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.41 และ 33.59 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างวิธี LCT และวิธี SPRCA พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดสอบเป็นลบ และให้ผลบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงใน Table 2 อีกทั้ง

เปอร์เซ็นต์การให้ผลบวกต่อจำนวนเซลล์ที่นำมาทดสอบ (percent reactive antibody; PRA) ก็พบว่าค่า PRA ระหว่าง 1-20 และค่า PRA >70 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ระหว่างสองวิธีนี้ ดังแสดงใน Table 3

นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี LCT โดยเริ่มตั้งแต่การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เวลาที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และซีรัมจนกระทั่งการอ่านผลการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 5 ชั่วโมง ส่วนวิธี SPRCA เริ่มตั้งแต่การแยก PRP แล้วทำการทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ Galileo Neo และพิมพ์รายงานผลการทดสอบ

Table 3 Percent reactive antibody to platelet detected by LCT and SPRCA techniques

Percent reactive antibody	Methods		p-value
	LCT (n = 134)	SPRCA (n = 170)	
1-20	26 (19.40%)	11 (6.47%)	$p < 0.001^*$
21-40	33 (24.63%)	34 (20.00%)	$p < 0.33$
41-70	29 (21.64%)	29 (17.06%)	$p < 0.31$
> 70	46 (34.33%)	96 (56.47%)	$p < 0.001^*$

*statistically significant (p -values < 0.05)

LCT, lymphocytotoxicity test; SPRCA, solid phase red cell adherence assay

จากเครื่องใช้เวลทั้งหมดประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดสอบด้วยวิธี SPRCA ใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธี LCT ถึง 3 ชั่วโมง

วิจารณ์

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดหรือผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดเป็นประจำอาจมีภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือดเกิดขึ้นได้ สาเหตุสำคัญได้แก่การที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA และ HPA ที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือดทำให้เกล็ดเลือดถูกทำลายอย่างรวดเร็วและทำให้การให้เกล็ดเลือดแก่ผู้ป่วยไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีต่อ HLA จะถูกพบได้บ่อยกว่าแอนติบอดีต่อ HPA¹⁰

ในการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ผู้ป่วยที่เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำและสงสัยว่ามีภาวะ PTR มีสาเหตุมาจาก alloimmune ร้อยละ 54.87 ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ในประเทศไทยคือร้อยละ 55.82 และ 63.78 โดย ภาวณิ คุปตวิทุฑ และ อรรถพล ศรีสุตติ ตามลำดับ^{10,16} ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Agarwal และคณะ¹⁷ และของ Sareben และคณะ¹⁸ ซึ่งพบผู้ป่วยที่มีภาวะ PTR เนื่องจาก alloimmune ร้อยละ 37.35 และ 29.7 ตามลำดับจากรายงานการรวบรวมของ Kao และ del Rossario¹⁹ พบว่าผู้ป่วย alloimmune จากการที่ได้รับ nonleukocyte-reduced blood components อยู่ในช่วงร้อยละ 30 ถึง 70 ซึ่งมีค่าที่อยู่ในช่วงของการศึกษานี้

จากผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี LCT ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 44.97 เทียบกับการตรวจด้วยวิธี SPRCA ซึ่งให้ผลบวกร้อยละ 66.41 ทั้งสองวิธีให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องด้วยการตรวจด้วยวิธี LCT จะใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มาทดสอบจึงตรวจพบได้เฉพาะ HLA แอนติบอดี รวมถึงข้อจำกัดของวิธี LCT แอนติบอดีที่ตรวจพบได้ต้องเป็น complement fixing antibody เท่านั้น ส่วนการตรวจ

ด้วยวิธี SPRCA จะใช้เซลล์ของเกล็ดเลือดโดยตรงจึงสามารถตรวจพบได้ทั้ง แอนติบอดีต่อ HLA และ HPA ซึ่งมีความไวและความจำเพาะกับการตรวจหา platelet antibody มากกว่าวิธี LCT ซึ่งใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การตรวจด้วยวิธี SPRCA ให้ผลบวกที่สูงกว่าวิธี LCT โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มี percent reactive antibody > 70% ซึ่งมีโอกาสในการหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันกับผู้ป่วยได้ยาก²⁰ จึงต้องมีการบริหารจัดการผู้ป่วยกลุ่มนี้ในการหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมเข้ากันได้ โดยการตามญาติสายตรงของผู้ป่วยมาเจาะเลือดเพื่อตรวจความเข้ากันได้ก่อน ในรายที่ให้ผลเป็นลบจึงจะตามมาบริจาค single donor plateletpheresis (SDP) ให้กับผู้ป่วยต่อไป โดยที่การใช้ SDP จากญาติสายตรงของผู้ป่วยต้องนำไปจ่ายรังสีก่อนเพื่อป้องกันการเกิด transfusion associated graft-vs-host disease (TA-GVHD)²¹ หรือการตรวจ HLA class I antigen typing ในผู้ป่วยเพื่อเลือกผู้บริจาคเกล็ดเลือดประจำที่มีผล HLA typing เหมือนหรือเข้ากันได้มาบริจาค SDP พร้อมทั้งทดสอบความเข้ากันได้ก่อนให้เกล็ดเลือดผู้ป่วยต่อไป หรืออาจมีกระบวนการส่งตรวจต่อเพื่อหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการหาเกล็ดเลือดที่เข้ากันได้ให้ผู้ป่วย ช่วยลดระยะเวลาการรอเกล็ดเลือดที่เหมาะสมเพื่อความปลอดภัยของผู้ป่วย นอกจากนี้อาจมีการวางแผนทางพัฒนาการตรวจในอนาคต เพื่อให้ทราบถึงชนิดของแอนติบอดีที่ทำให้เกิด alloimmune PTR ว่าเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HLA และหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPA เพื่อที่ทางห้องปฏิบัติการจะได้จัดเตรียมเกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือด ABO ตรงกันหรือเข้ากันได้และต้องไม่มี HLA/HPA แอนติเจนตรงกันกับชนิดของแอนติบอดีของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ เป็นการเปรียบเทียบการตรวจสองวิธีโดยใช้ข้อมูลย้อนหลัง ไม่ได้มีการควบคุมปัจจัยที่อาจมีผลต่อระดับเกล็ดเลือดของผู้ป่วยและไม่ได้มาจากกลุ่มประชากรเดียวกันซึ่งอาจมีความแตกต่างกันระหว่างประชากรได้

สรุป

จากการศึกษาผู้ป่วยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำและไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion refractoriness) พบว่าเป็นภาวะ alloimmunization มากถึงร้อยละ 54.87 โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ด้วยวิธี SPRCA สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้มากกว่าวิธี LCT อีกทั้งยังใช้ระยะเวลาในการตรวจที่สั้นกว่า นอกจากนี้กระบวนการทดสอบความเข้ากันได้ของเกล็ดเลือดด้วยวิธี SPRCA โดยทำปฏิกิริยาระหว่างซีรัมของผู้ป่วยและเกล็ดเลือดของผู้บริจาคมีความเข้ากันได้หรือไม่ เป็นการคัดเลือกเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย เพื่อให้การรักษาด้วยเกล็ดเลือดมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *JAMA*. 1910;55:1185-92.
2. Han T, Stutzman L, Cohen E, Kim U. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia. An autopsy study. *Cancer*. 1966;19:1937-42.
3. Sesok-Pizzini D, Herman JH. Platelet transfusion therapy. In: Mintz PD, editor. *Transfusion therapy: clinical principles and practice*. 3rd ed. Bethesda, MD: AABB Press; 2011:397-432.
4. Nahiriak S, Slichter SJ, Tanael S, Rebull P, Pavenski K, Vassallo R, et al. Guidance on platelet transfusion for patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Transfus Med Rev*. 2015;29:3-13.
5. Kerkhoffs JL, Eikenboom JC, van de Watering LM, van Wordragen-Vlaswinkel RJ, Wijermans PW, Brand A. The clinical impact of platelet refractoriness: correlation with bleeding and survival. *Transfusion*. 2008;48:1959-65.
6. 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.
7. Delafior-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev*. 2000;14:180-96.
8. Kittivorapart J. Platelet transfusion refractoriness. *J Hematol Transfus Med*. 2020;30:281-91.
9. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol*. 2008;142:348-60.
10. 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.
11. 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 Engl J Med*. 1997;337:1861-9.
12. Hopkins KA. The basic lymphocyte microcytotoxicity tests: standard and AHG enhancement. In: Hahn AB, Land GA, Strothman RM, editors. *ASHI laboratory manual*. 4th ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2000: I.C.1.1-I.C.1.7.
13. Capture-guide version 200. USA: Norcross, GA: Immucor, Inc.; 2005.
14. Capture-P[®] solid phase system for the detection of IgG antibodies to platelets [package insert]. USA: Norcross, GA: Immucor, Inc.; 2017.
15. Social Science Statistics. [cited on 2 February 2022] Available from: <http://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default2.aspx>.
16. Kupatawintu 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.
17. Agarwal N, Chatterjee K, Sen A, Kumar P. Prevalence of platelet reactive antibodies in patient's refractory to platelet transfusions. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8:126-7.
18. Sareban N, Macher S, Drexler C, Posch U, Lanzer G, Schallmoser K. Platelet antibody analysis by three different tests. *J Clin Lab Anal*. 2015;29:198-202.
19. Kao KJ, del Rosario M. Platelet alloimmunization. In: Anderson KC, Ness PM, editors. *Scientific basis of transfusion medicine: implications for clinical practice*. Philadelphia: WB Saunders; 2000: 409-19.
20. Bintaprasit W, Kittisares K, Apisawes K, Chaisongkam D, Thanaketpaisarn Y. The availability of LCT-crossmatched platelets for patients with platelet refractoriness. *J Hematol Transfus Med*. 2017;3:225-31.
21. Stroncek DF, Vassallo RR. Platelet and granulocyte antigens and antibodies. In: Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, editors. *Technical manual*. 20th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2020. p 464.

