

บทความพิเศษ

Virtual crossmatching

อภิวรธ ติยะพรรณ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทนำ

การจัดสรรไตจากผู้บริจาคสมองตาย จะต้องมีการตรวจ lymphocyte crossmatching ของเซลล์เม็ดเลือดขาวผู้บริจาคและซีรัมผู้ป่วย เพื่อตรวจสอบว่าผู้ป่วยมี preformed HLA antibody ต่อผู้บริจาคหรือไม่ ซึ่งจะนำไปสู่ภาวะ antibody-mediated rejection และ early graft loss ได้ แต่การทำ lymphocyte crossmatching มีความยุ่งยากและใช้เวลานาน ทำให้เวลาที่ไตถูกตัดออกมาแช่อยู่ใน ถู่งนำแข็งก่อนการปลูกถ่าย (cold ischemic time) ยาวนานขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ delayed graft function, graft loss ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการตรวจ HLA antibody ด้วย solid phase assay คือการใช้ bead ที่มี HLA antigen สกัดอยู่บนผิว ซึ่งจะมี sensitivity และ specificity สูง และการใช้ single antigen bead (SAB) จะสามารถตรวจ HLA antibody specificity ในผู้ป่วย จึงสามารถตรวจได้ว่าผู้ป่วยมี donor specific antibody (DSA) ต่อผู้บริจาคหรือไม่ และสามารถทำนายผลการทำ crossmatching ได้ ซึ่งเรียกว่า virtual crossmatching ซึ่งสามารถลดเวลา cold ischemic time ได้ แต่ virtual crossmatching ก็มีข้อดีข้อเสีย และข้อควรระวังในการนำมาใช้แทน lymphocyte crossmatching เช่นกัน บทความนี้จะจึงขอทบทวนความแตกต่างของ physical และ virtual crossmatching และแนวทางการนำ virtual crossmatching มาใช้ในการจัดสรรไตจากผู้บริจาคสมองตาย

Physical crossmatching (PXM) คือ การตรวจสอบความเข้ากันได้โดยการผสมเซลล์ลิมโฟไซต์ T หรือ B ของผู้บริจาคและซีรัมของผู้ป่วยด้วยกันว่ามีปฏิกิริยาเกิดขึ้นหรือไม่

1. Complement-dependent cytotoxicity (CDC) crossmatching คือนำเซลล์ผู้บริจาคและซีรัมผู้ป่วยผสมกับโปรตีน complement แล้วอ่านผลจากเซลล์ตายซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของโปรตีนบนผิวเซลล์ผู้บริจาคกับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย

2. Flow cytometry crossmatching คือ นำเซลล์ผู้บริจาคและซีรัมผู้ป่วย ผสมกับ antihuman IgG polyclonal antibody ที่ติดฉลาก fluorescein หากมีแอนติบอดีที่เกาะกับเซลล์ผู้บริจาคได้ ก็จะมี antihuman IgG antibody ที่ติดฉลากไปเกาะได้ และสามารถอ่านได้ด้วย flow cytometry โดยผล positive จะบอกได้ว่ามีการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน ข้อดีคือ มี

sensitivity สูงกว่า CDC crossmatching แต่ข้อเสียคือ ผลบวกไม่ได้บ่งบอกถึงความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของแอนติบอดีเหมือน CDC

Virtual crossmatching คือ การตรวจสอบความเข้ากันได้ โดยทำการตรวจ แอนติบอดีผู้ป่วย ด้วยวิธี single antigen bead (SAB) บอก specificity แอนติบอดีของผู้ป่วย และบอก unacceptable antigen คือ HLA antigen ที่ตรงกับผู้ป่วยนั้นๆ ได้¹ โดยหากผู้ป่วยมีแอนติบอดี ความจำเพาะตรงกับ HLA antigen ผู้บริจาค จะถือว่าผู้ป่วยมี donor specific antibody (DSA) และคาดการณ์ว่าผล PXM น่าจะเป็นบวก ซึ่งการอ่านแอนติบอดีจะต้องมีความแรง (mean fluorescence index; MFI) มากเกินตัวเลขที่กำหนด ซึ่งต่างไปตามแต่ละสถาบัน หากกำหนดสูงเกินไป จะทำให้ไม่สามารถตรวจจับ DSA ที่มีความแรงต่ำๆ ได้ แต่ถ้ากำหนดต่ำเกินไป จะทำให้กำหนด DSA เกินความจำเป็น ทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสการได้รับอวัยวะ หรือได้รับยากดภูมิคุ้มกันเกินความจำเป็นได้

Virtual crossmatching และ flow cytometry มี sensitivity, specificity และ accuracy ในการตรวจจับ DSA ใกล้เคียงกัน แต่การใช้ virtual crossmatching จะช่วยในการทำให้ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันมากซึ่งปกติหาได้เข้ากันได้ยาก และช่วยลดการทำ physical crossmatching ที่ไม่จำเป็นลง มีหลายงานวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่ทำ virtual crossmatching เท่านั้น ไม่ได้มี hyperacute rejection และ acute antibody-mediated rejection เพิ่มขึ้น และไม่ได้มี patient หรือ graft survival ต่างกับกลุ่มที่ทำ physical crossmatching อย่างมีนัยสำคัญ

ข้อดีข้อเสียของ VXM

ข้อดีของ VXM คือจะลด cold ischemic time เมื่อเทียบกับ PXM (ค่าเฉลี่ย 15 และ 16.5 ชั่วโมง ตามลำดับ) ในขณะที่ mortality และ death-censored allograft failure ใกล้เคียงกัน² cold ischemic time มีความสัมพันธ์กับ delayed graft function, organ discard และ graft failure³ นอกจากนี้ VXM มี specificity สูงกว่า PXM เนื่องจากตรวจแอนติบอดีต่อ HLA โดยตรง ในขณะที่ PXM อาจ false positive จาก non-HLA

antibody หรือ non-specific antibody⁴ VXM ยังสามารถตรวจ low titer antibody ได้²

ข้อเสียของ VXM นั้น SAB อาจ false negative ได้จาก 1) ไม่มี bead ที่มี specificity นั้นๆ 2) Lot-to-lot variability 3) โครงสร้าง HLA antigen แต่ละบริษัทไม่เหมือนกัน 4) Shared epitope ทำให้ antibody จับได้หลาย bead จนความแรงเจือจางลง 5) Prozone effect ในขณะที่เดียวกัน ก็อาจเกิด false positive จาก antigen บน bead เกิดการ denature ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดได้ตามปกติ²

การทำ HLA typing สำหรับผู้บริจาคไตสมองตาย ส่วนมากยังนิยมทำในระดับ low to intermediate resolution อยู่ จึงต้องมีค่าใช้จ่ายที่มากขึ้นในการทดสอบและการจัดระบบใหม่ และอาจต้องตามผู้ป่วยใน pool มาทำ HLA typing ใหม่

PXM สามารถตรวจจับ non-HLA antibody ได้ เช่น HNA antibody โดย T และ B lymphocyte สามารถแสดง HNA-3 ซึ่ง antibody ต่อ HNA-3 สามารถทำให้เกิด rejection ได้ ซึ่งมักพบในผู้ที่มีประวัติตั้งครุฑเท่านั้น⁵

แนวทางการใช้ VXM ในการจัดสรรไตจากผู้บริจาคสมองตาย การนำ VXM มาใช้นั้น มี 2 รูปแบบ แบบแรกคือนำมาทำนายผล PXM เท่านั้น เพื่อช่วยในการจับคู่ผู้ป่วยกับผู้บริจาค และต้องทำ PXM ตามหลัง (prospective PXM) แบบที่สองคือ นำมาแทนที่ PXM เลย BSHI/BTS guidance กำหนดว่า หากผู้ป่วยมี HLA antibody ที่ระบุ specificity ไม่ได้ มี HLA antibody ที่เป็น DSA หรือบอกไม่ได้ว่าเป็น DSA หรือไม่ เพราะไม่มีข้อมูล HLA typing ของผู้บริจาคใน locus นั้นๆ ต้องทำ PXM ส่วนกรณีอื่นๆ การทำ PXM ตามหลัง VXM นั้น หากมีการตรวจสอบแล้วว่าผล VXM และ PXM ในห้องปฏิบัติการนั้นๆ สอดคล้องกัน สามารถให้ทำ VXM⁶ โดยไม่ต้องทำ PXM ได้

Pinelli และคณะ⁶ ได้กำหนดไว้ว่า VXM จะใช้แทน PXM ได้เมื่อ

1. ตรวจหลาย sample ผู้ป่วยนั้นๆ ไม่มีช่องว่างของเวลาที่สำคัญ
2. Sample สุดท้ายห่างไม่เกิน 6 เดือน
3. หลังจาก sample สุดท้ายถึงปัจจุบัน ยืนยันได้ว่าไม่มีประวัติถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
4. ไม่มีปัญหาเรื่อง antibody to shared epitope
5. ไม่มีผล flow cytometry crossmatch positive ที่ไม่ได้คาดการณ์ไว้ก่อน

การเปลี่ยนจาก physical เป็น virtual crossmatching สามารถทำได้เป็นขั้นตอน ตัวอย่างเช่นการทำ virtual crossmatching ของประเทศออสเตรเลีย เริ่มจากการเพิ่มความถี่ในการทำ antibody

screening จากหนึ่งเป็นสี่ครั้งต่อปี เพิ่มการ identify unacceptable antigen จากนั้นจึงเริ่มทำ virtual crossmatching เท่านั้น ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต หรือไตร่วมกับตับอ่อน ที่ไม่มีความเสี่ยงด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น ได้รับโลหิต การปลูกถ่ายอวัยวะมาก่อน หรือประวัติการตั้งครุฑ ส่วนผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือผู้ป่วยปลูกถ่ายตับ ปอด หัวใจ ยังต้องทำ CDC crossmatching จนในปัจจุบันได้ให้ผู้ป่วยปลูกถ่ายทุกอวัยวะทำเพียง virtual crossmatching เท่านั้น ยกเว้นกลุ่มที่มีความเสี่ยงด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้องทำ flow cytometry crossmatching ด้วย⁷

สรุป

Virtual crossmatching เป็นแนวทางใหม่ในการทดสอบความเข้ากันได้ในการปลูกถ่ายอวัยวะ ซึ่งช่วยลด cold ischemic time และเพิ่มความจำเพาะของการตรวจ antibody ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการคัดสรรไตที่ถูกต้องและมีคุณภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามการนำ virtual crossmatching มาใช้ไม่ว่าจะเป็นการใช้ร่วมหรือการแทนที่ physical crossmatching ต้องคำนึงถึงข้อดีข้อเสียเมื่อเทียบกับ physical crossmatching สถานะการถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยรวมไปถึงห้องปฏิบัติการ และภาพรวมการปลูกถ่ายอวัยวะในประเทศนั้นๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Claas FHJ, Heidt S. Virtual crossmatching for deceased donor transplantation becomes reality. *Kidney Int.* 202;97:657-9.
2. Bhaskaran MC, Heidt S, Muthukumar T. Principles of virtual crossmatch testing for kidney transplantation. *Kidney Int Rep.* 2022;7:1179-88.
3. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int.* 2015;87:343-9.
4. Morris AB, Sullivan HC, Krummey SM, Gebel HM, Bray RA. Out with the old, in with the new: virtual versus physical crossmatching in the modern era. *HLA.* 2019;94:471-81
5. Peacock S, Briggs D, Barnardo M, Battle R, Brookes P, Callaghan C, et al. BSHI/BTS guidance on crossmatching before deceased donor kidney transplantation. *Int J Immunogenet.* 2022;49:22-9.
6. Pinelli DF, Tambur AR. Virtual crossmatching for deceased donor transplantation: one size does not fit all. *Kidney Int.* 2020;97:659-62.
7. Francis R, Holdsworth R, Watson N, Nicol A. Transitioning to a national virtual crossmatch protocol for solid organ transplant offers in Australia. *Transplant J Australasia.* 2021;30:18-20.