

นิพนธ์ต้นฉบับ

Detection of Platelet Antibodies by Platelet Suspension Immunofluorescent Technique

ปรียานาถ วงศ์จันทร์ และศรียา ฟองมูล

ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ: ปัจจุบันวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดที่ทำได้ง่ายและมีความน่าเชื่อถือได้ มีความจำเป็นสำหรับช่วยแพทย์ในการตรวจและใช้เป็นแนวทางในการรักษาติดตามอาการในผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ ที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำร่วมด้วย การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการนำเทคนิค platelet suspension immunofluorescent test (PSIFT) ซึ่งใช้หลักการของ indirect immunofluorescent technique มาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ ที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำร่วมด้วยจำนวน 84 ราย จากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยเจือจาง FITC-conjugated rabbit anti-human immunoglobulins เป็น 1:30 ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผลการศึกษาพบว่าเทคนิคดังกล่าวมีความจำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือด มีความจำเพาะของปฏิกิริยาและมีความไวของเทคนิคพอสมควร รวมทั้งมีความเที่ยงตรงในการอ่านผลของปฏิกิริยาด้วย ผลการตรวจสอบซีรัมผู้ป่วยพบว่าตัวอย่างซีรัม 84 ราย ให้ผลบวกโดยวิธี PSIFT จำนวน 41 ราย คิดเป็น 48.8% เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี lymphocytotoxicity test ให้ผลลบทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในซีรัมดังกล่าวไม่ใช่แอนติบอดีต่อ HLA แอนติเจน และเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ glycoprotein IIb/IIIa ที่บริสุทธิ์เป็นแอนติเจน พบว่าซีรัมทั้ง 41 รายให้ผลบวก แสดงให้เห็นว่าในซีรัมมีแอนติบอดีจำเพาะต่อโมเลกุล glycoprotein IIb/IIIa และ/หรือ platelet specific antigen ใดๆ ที่อยู่บนโมเลกุลดังกล่าว

Key Words : ● PSIFT ● HLA class I ● Platelet glycoprotein IIb/IIIa

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:73-83.

เกร็ดเลือดเป็น cytoplasmic fragments จึงไม่มีนิวเคลียสและ DNA อย่างไรก็ตามบนผิวของเกร็ดเลือดประกอบด้วยโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ glycoproteins, gly-

colipids, ceramides, glucosylceramides, lactosylceramides, trihexosyl, globosides, hematoside, proteoglycans และ sulfated proteins เช่น chondroitin sulfate โมเลกุลต่างๆ เหล่านี้สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง glycoproteins ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลที่มีปริมาณมากที่สุดบนผิวเกร็ดเลือด บนส่วนของโมเลกุลมีตำแหน่งแสดง antigenic deter-

ได้รับต้นฉบับ 1 พฤษภาคม 2544 และให้ตีพิมพ์ 24 มิถุนายน 2544
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางปรียานาถ วงศ์จันทร์ ภาควิชาภูมิคุ้มกัน
วิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถนน อินทวโรส
ต.ศรีภูมิ อ.เมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

minant และกำหนดลักษณะของ platelet specific antigens (human platelet specific antigen, HPA) ซึ่งแตกต่างกันได้ในแต่ละบุคคล นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการแข็งตัวของเลือดระยะปฐมภูมิ โดยมีส่วนทำให้เกิดการเกาะกลุ่มและการเกาะตัวของเกร็ดเลือดเพื่อซ่อมแซมผนังหลอดเลือดที่ฉีกขาด¹

ที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากในปัจจุบันผู้ป่วยที่มาเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมารักษาเชิงใหม่ด้วยอาการป่วยจากโรคเลือดชนิดต่างๆ มีเป็นจำนวนมาก ได้แก่ acute lymphoblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia, chronic myeloblastic leukemia, aplastic anemia, idiopathic thrombocytopenic purpura, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma ผู้ป่วยเหล่านี้ในบางรายมีภาวะเกร็ดเลือดต่ำร่วมด้วย ในปัจจุบันการรักษาภาวะดังกล่าวคือการให้เกร็ดเลือดเข้มข้น เพื่อรักษาระดับเกร็ดเลือดและป้องกันเลือดออกในอวัยวะต่างๆ ที่สำคัญคือเลือดออกในสมองซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตได้ การให้เกร็ดเลือดเข้มข้นแก่ผู้ป่วยอาศัยเพียงการตรวจสอบหมู่เลือดให้ตรงกันเท่านั้น ยังไม่มีการตรวจความเข้ากันได้ของเกร็ดเลือด ดังนั้นในผู้ป่วยบางรายอาจได้รับเกร็ดเลือดที่มี platelet antigens ที่ต่างกันและกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีขึ้น ผลคือทำให้เกิดการทำลายเกร็ดเลือดที่ได้รับเข้าไปภายหลัง และไม่สามารถรักษาระดับเกร็ดเลือดให้เป็นปกติได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคเลือดหลายชนิด แม้จะไม่ได้รับเกร็ดเลือดก็ตาม พบว่าเกิดภาวะเลือดออกในอวัยวะต่างๆ ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ แอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือดของตนเองเช่น แอนติบอดีต่อไกลโคโปรตีนบนผิวเกร็ดเลือดเป็นต้น

ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงสาเหตุของการมีภาวะเกร็ดเลือดต่ำจากการมีแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเกร็ดเลือด จึงมีความจำเป็นในการนำเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเกร็ดเลือดมาใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อแนวทางการรักษาภาวะเกร็ด

เลือดต่ำ นอกจากนี้ยังอาจพัฒนาวิธีการเพื่อนำไปใช้ในการตรวจความเข้ากันได้ของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยที่ตรวจพบมีแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือด โดยการตรวจปฏิบัติการระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับเกร็ดเลือดของผู้ให้

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดมีอยู่หลายวิธี¹ แต่ละวิธีมีหลักการและข้อดีข้อเสียต่างกันไปได้แก่ platelet agglutination, platelet complement fixation, complement-dependent ⁵¹Cr หรือ ¹¹¹In release, consumption assay antiglobulin, enzyme-linked immunofluorescent assay, platelet suspension immunofluorescent test (PSIFT), platelet adhesion immunofluorescent test (PAIFT), radioactive labelled antiglobulin test ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เลือกใช้วิธี PSIFT ในการตรวจสอบแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดเนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สามารถหาได้และมีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ หลักการคือใช้เกร็ดเลือดทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย หากแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเกร็ดเลือด จะทำปฏิกิริยาจับกัน เมื่อเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็น anti-human immunoglobulins และติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ก็จะทำให้เกิดการเรืองแสงให้เห็นได้ เทคนิคนี้มีข้อเสียคือต้องใช้เกร็ดเลือดเข้มข้นที่เตรียมใหม่เสมอ ขั้นตอนการล้างอาจทำให้เกิดการสูญเสียเกร็ดเลือดไปได้บ้าง นอกจากนี้อาจมีผลบวกปลอมได้ในซีรัมผู้ป่วยไตวายที่ได้รับการล้างไต เนื่องจากสารจำพวก N-linked protein ในชุดล้างไตสามารถกระตุ้นการสร้าง anti-N like antibody

ดังนั้นวัตถุประสงค์คือการศึกษาเบื้องต้นในการนำวิธีการ PSIFT มาใช้ในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลมารักษาเชิงใหม่ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำจากโรคเลือดชนิดต่างๆ และผู้ป่วยที่มีปัญหาเลือดออกโดยไม่ทราบสาเหตุ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม ผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ ที่ขอเกร็ดเลือดเข้มข้นจากงานธนาคารเลือดจำนวน 84 ราย

สารเคมีและน้ำยา stock PFA/PBS (paraformaldehyde 4% (w/v) ใน PBS ปรับ pH เป็น 11), working PFA/PBS (25% stock PFA/PBS ใน PBS ปรับ pH เป็น 7.2), FITC-conjugated rabbit anti-human Igs (DAKO), HRP-rabbit anti-human Igs, anti-HLA positive และ negative controls, Rees-Ecker, Turk's solution (3% glacial acetic acid, 1% aqueous gentian), Ficoll-Hypaque solution, 37% neutral formalin (37% formalin 1 ส่วน 0.04% phenol red 1 ส่วน ปรับ pH เป็น 7.2), glycerol/PBS pH 7.2 (glycerol 3 ส่วน PBS 1 ส่วน), Rabbit complement, 2.5N H₂SO₄ 0.05% Tween/PBS pH 7.2.

การเตรียม PFA-fixed platelet suspension² เจาะเก็บเลือดคนปกติหมู่โลหิตโอจำนวน 5 ราย โดยใช้ 5% Na₂EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งในอัตราส่วนเลือด 9:1 ปั่นเบาที่ 800 g 5 นาที เพื่อเตรียม platelet rich plasma จากนั้นปั่นซ้ำอีกครั้งที่ 2,800 g นาน 20 นาที นำ platelet concentrate ที่ได้รวมกัน ปั่นล้างสองครั้งด้วย EDTA-PBS และกระจายเกร็ดเลือดใน 1%

paraformaldehyde/PBS (1% PFA/PBS) ปริมาตร 3 มล. ตั้งทิ้งในอุณหภูมิห้อง 2-5 นาที จากนั้นล้างอีก 2 ครั้งด้วย EDTA/PBS นับจำนวนเกร็ดเลือดด้วยน้ำยา Ree's and Ecker และปรับให้ได้ความเข้มข้น 150x10⁶/mL

การทำปฏิกิริยา indirect immunofluorescent technique นำซีรัมและ PFA-fixed platelet ปริมาตร 50 μ L เท่ากัน ผสมรวมกันใน microcentrifuge tube อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 2 ครั้ง (15,000 rpm 5 นาที) ด้วย EDTA/PBS pH 7.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 25 μ L เติม FITC-conjugated rabbit anti-human Igs ที่เจือจาง 1:30 ปริมาตร 25 μ L อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นปั่นล้าง 3 ครั้ง กระจายเกร็ดเลือดด้วย glycerol/PBS ปริมาตร 10 μ L หยดบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกแก้ว และนำไปตรวจดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซนส์

การตรวจสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เตรียม PFA-fixed platelet suspension ตามวิธีข้างต้น ทำปฏิกิริยากับ HLA positive และ/หรือ HLA negative control เจือจาง FITC-rabbit anti-human Igs ความเข้มข้น 1:30 ด้วย EDTA-PBS เตรียมรูปแบบของปฏิกิริยาเป็น 9 ชุดการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมี EDTA/PBS เป็น conjugate control

ตารางที่ 1 Optimal volume and titer of FITC-conjugated rabbit anti-human immunoglobulins

Tube No.	Controls	Titer*	Volume (μ L)*	Grading
1	HLA positive control	1:30	50	4+
2	HLA negative control	1:30	50	Negative
3	HLA positive control	1:50	50	3+
4	HLA negative control	1:50	50	Negative
5	HLA positive control	1:30	25	4+
6	HLA negative control	1:30	25	Negative
7	HLA positive control	1:50	25	3+
8	HLA negative control	1:50	25	Negative
9	EDTA-PBS conjugate control	1:30	50	Negative

* FITC-conjugated rabbit anti-human immunoglobulins

การทดสอบความจำเพาะของ FITC-conjugated rabbit anti-human Igs เตรียม PFA-fixed platelet suspension ตามวิธีข้างต้น จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ HLA positive control ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:2-1:64 แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด หลังจากทำปฏิกิริยาระหว่าง PFA-fixed platelet suspension และ HLA positive control ปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย EDTA/PBS จากนั้นเติม rabbit anti-human IgG ที่เจือจาง 1:2, 1:5 และ 1:10 สำหรับชุดที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย EDTA/PBS จากนั้นเติม FITC-conjugated rabbit anti-human Igs ที่เจือจาง 1:30 ปริมาตร 25 μL อบที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ครบเวลาปั่นล้าง 3 ครั้ง กระจายเกร็ดเลือดใน glycerol/PBS ปริมาตร 10 μL แล้วตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา PSIFT นำซีรัมต่อไปนี้คือ anti-HLA positive, anti-A positive, anti-B positive, anti-D positive และ anti-E positive ทำปฏิกิริยากับ PFA-fixed platelet suspension ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น และเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นในแต่ละชุดการทดสอบ

การทดสอบความไวของปฏิกิริยา PSIFT เจือจาง HLA positive serum เป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 1:2-1:64 นำซีรัมดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ PFA-fixed platelet suspension ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น และส่วนหนึ่งนำไปศึกษาด้วยวิธี lymphocytotoxicity test

Lymphocytotoxicity test เจาะเลือดคนปกติหมู่โลหิตโอ จำนวน 5 รายและต่างกลุ่มกันกับกลุ่มที่ใช้เตรียม platelet suspension โดยให้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง (80 μL ต่อเลือด 20 mL) ปั่นแยกเฉพาะ PBMC ด้วยวิธี Ficoll-hypaque gradient centrifugation ปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS pH 7.2 และปรับความเข้มข้นเป็น $2-3 \times 10^6$ cells/mL ทำปฏิกิริยาระหว่าง peripheral blood mononuclear cell (PBMC) กับ

anti-HLA serum ใน Terasaki plate ดังนี้ ใช้ anti-HLA serum 1 μL ต่อ PMBC suspension 1 μL (2,000-3,000 cell/well) เติมน้ำมัน 5 μL ลงในแต่ละหลุมเพื่อป้องกันการระเหยของซีรัมและน้ำภายในหลุม อบไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ครบเวลาเติม Rabbit complement ปริมาตร 5 μL /well ทั้งให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นเติม 5% Eosin 5 μL /well ทั้งไว้ 2-3 นาทีแล้วเติม formalin/PBS pH 7.2 5 μL /well สุดท้ายเติมน้ำมันให้ท่วมเพลทเพื่อป้องกันการระเหย จากนั้นปิดฝาและเก็บค้างคืนที่ 4°C เพื่อให้เซลล์ตกลงกันหลุม รุ่งเช้าอ่านผลโดยใช้กล้อง inverted microscope กำลังขยาย 10X โดยมีมาตรฐานการแปลผลดังแสดงในตารางที่ 4

การทดสอบผลของ paraformaldehyde ที่มีต่อแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือด เตรียมเกร็ดเลือดเข้มข้นและกระจายเกร็ดเลือดในตัวกลาง PBS และ 1%PFA/PBS โดยให้มีความเข้มข้น $150 \times 10^6/\text{mL}$ จากนั้นทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัม anti-HLA positive ที่เจือจาง 1:2-1:64 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาปั่น 10,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสและนำไปทำปฏิกิริยา PSIFT กับ PFA-fixed platelet suspension ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

การทดสอบ reproducibility ของ PSIFT เตรียมซีรัม anti-HLA positive ที่เจือจาง 1:2-1:64 สำหรับการทดสอบ 5 ครั้ง จากนั้นนำไปทดสอบ PSIFT กับ PFA-fixed platelet suspension ซึ่งเตรียมใหม่ทุกวัน เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

การศึกษาในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่ขอเกร็ดเลือด เก็บซีรัมผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ ที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำร่วมด้วย จำนวน 84 ราย ทำการศึกษาตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ตรวจสอบแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดด้วยวิธี PSIFT
2. ตรวจสอบแอนติบอดีต่อ HLA แอนติเจนด้วยวิธี Lymphocytotoxicity ในซีรัมที่ให้ผลบวกในข้อ 1

3. ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อไกลโคโปรตีนของเกร็ดเลือด โดยใช้ purified GP IIb/IIIa เป็นแอนติเจน ในซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดด้วยวิธี PSIFT จากข้อ 1

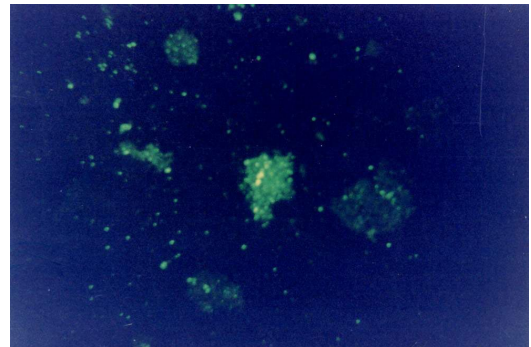
Indirect ELISA เคลือบเพลทด้วย purified GP IIb/IIIa ความเข้มข้น $2 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}/\text{well}$ อบข้ามคืนที่ 4°C รุ่งเช้าล้างออกด้วย 0.05% tween-PBS (PBST) จากนั้น block ด้วย 2% BSA/PBS ปริมาตร $100 \mu\text{L}/\text{well}$ อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างหนึ่งครั้งด้วย PBST เติมซีรัมผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับวิธี PSIFT $50 \mu\text{L}/\text{well}$ อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง 3 ครั้งด้วย PBST จากนั้นเติม HRP-conjugated rabbit anti-human Igs เจือจาง 1:2,000 ปริมาตร $50 \mu\text{L}/\text{well}$ อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง 4 ครั้งด้วย PBST สุดท้ายเติม TMB substrate (SIGMA) ปริมาตร $100 \mu\text{L}/\text{well}$ อบที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย $2.5\text{N H}_2\text{SO}_4$ $50 \mu\text{L}/\text{well}$ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm

ผลการทดลอง

จากการศึกษาหาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ FITC-conjugated rabbit anti-human Igs สำหรับใช้ในการทดสอบพบว่า ที่เจือจาง 1:30 และ

ปริมาตร $25 \mu\text{L}$ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถแยกผลปฏิกิริยาบวกและลบได้ชัดเจน โดยมีการติดสีเข้ม (intensity) เป็น 4+ (รูปที่ 1) และให้ผลบวกกับเกร็ดเลือดทุกราย ดังแสดงในตารางที่ 1

ผลการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา immunofluorescent technique เนื่องจากในขั้นตอนการทดสอบใช้แอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในการตรวจจับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อการทดสอบว่า FITC-conjugated rabbit anti-human Igs จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติบอดีเท่านั้น ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า FITC-conjugated rabbit anti-human Igs ทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับส่วนที่เป็น immunoglobulins เท่านั้น จะไม่เกิดผลบวกปลอมจากการเข้าจับระหว่าง FITC-conju-



รูปที่ 1 Illustration of 4+ reaction by platelet suspension immunofluorescent test (PSIFT)

ตารางที่ 2 Specificity test of the immunofluorescent test

Dilution of anti-HLA	Dilution of unconjugated rabbit anti-human IgG			PBS control
	undilute	1:5	1:10	
1:2	weak	1+	2+	4+
1:4	negative	weak	2+	2+
1:8	negative	weak	1+	2+
1:16	negative	weak	weak	2+
1:32	negative	negative	weak	2+
1:64	negative	negative	weak	1+

gated rabbit anti-human Igs กับแอนติ-เจนบนผิวเม็ดเลือด

ในซีรัมที่นำมาตรวจสอบประกอบด้วยแอนติบอดีหลายชนิด เพื่อทดสอบว่าในเทคนิค PSIFT นั้น แอนติบอดีที่ตรวจพบเป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดเท่านั้น พบว่าแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่แอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดไม่ทำปฏิกิริยาเมื่อใช้เทคนิค PSIFT ดังแสดงในตารางที่ 3

สำหรับการทดสอบความไวของปฏิกิริยาโดยใช้ anti-HLA serum ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นซีรัมควบคุมเปรียบเทียบกับวิธี lymphocytotoxicity test พบว่าด้วยวิธี PSIFT และวิธี lymphocytotoxicity test ให้ผลบวกต่อซีรัมที่ไตเตอร์ 64 และ 32 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

Paraformaldehyde ที่ใช้ในการตรึงผิวเม็ดเลือดจะต้องไม่มีผลทำให้เม็ดเลือดแสดงแอนติเจนมากกว่า

ตารางที่ 3 Specificity test of PSIFT

Serum controls	Fluorescent intensity
HLA positive serum	4+
Anti-A positive serum	negative
Anti-B positive serum	negative
Anti-D positive serum	negative
Anti-E positive serum	negative

ปกติ หรือในทางกลับกันไปมีผลลบกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือด ในการทดลองที่ใช้ absorbed serum สองชุด ซึ่งได้จากการดูดซับด้วย PFA-fixed และ/หรือ PFA-unfixed platelet ก่อนการทดสอบด้วยวิธี PSIFT ตามปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในไตเตอร์ของซีรัมที่ใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5

เนื่องจากขั้นตอนการอ่านผล PSIFT เป็นการอ่านผลด้วยสายตาซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบความเที่ยงตรงในการอ่านผลของตัวอย่างเดียวกันที่ทำในแต่ละวัน โดยใช้ anti-HLA serum เป็นตัวอย่างควบคุม ทดสอบเป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน พบว่าให้ผลตรงกัน ดังแสดงในตารางที่ 6

การทดสอบตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ จำนวน 84 ราย พบว่าให้ผลบวกโดยวิธีนี้จำนวน 41 รายคิดเป็น 48.8% ดังแสดงในตารางที่ 7 และเมื่อนำซีรัมที่ให้ผลบวกมาทดสอบเพื่อจำแนกความจำเพาะของแอนติบอดี เนื่องจากบนผิวเม็ดเลือดมีโมเลกุล HLA class I เช่นกัน และแอนติบอดีที่ตรวจพบอาจเป็นแอนติบอดีต่อโมเลกุลดังกล่าว โดยการตรวจยืนยันด้วยวิธี lymphocytotoxicity พบว่าซีรัมทั้ง 41 รายให้ผลลบทั้งหมดคิดเป็น 100% แสดงว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบนั้นเป็นแอนติบอดีต่อโมเลกุลอื่นบนผิวเม็ดเลือดที่ไม่ใช่ HLA class I นอกจากนี้เมื่อทดสอบยืนยันด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ purified GPIIb/IIIa เป็นแอนติเจนพบ

ตารางที่ 4 Sensitivity test of PSIFT as compare to the standard lymphocytotoxicity test

Dilution of serum	Fluorescent intensity	Lymphocytotoxicity score
1:2	4+	8
1:4	4+	8
1:8	4+	8
1:16	3+	8
1:32	3+	6
1:64	2+	1
1:128	negative	negative

ตารางที่ 5 The effects of paraformaldehyde to PSIFT

Dilution of serum	1 fixed platelet vs adsorbed serum	2 unfixed platelet vs adsorbed serum	3 unabsorbed serum
1:2	2+	2+	4+
1:4	1+	1+	4+
1:8	negative	negative	3+
1:16	negative	negative	2+
1:32	negative	negative	2+
1:64	negative	negative	1+

ตารางที่ 6 Reproducibility test of PSIFT

Dilution of serum	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5
1:2	4+	4+	4+	4+	4+
1:4	4+	4+	4+	4+	4+
1:8	4+	4+	3+	3+	3+
1:16	3+	3+	2+	2+	2+
1:32	3+	2+	2+	1+	1+
1:64	2+	2+	1+	1+	1+
1:128	negative	negative	negative	negative	negative

ว่าซีรัมที่นำมาทดสอบจำนวน 29 รายให้ผลบวกต่อทั้งหมดยกเว้นค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าปริมาณน้อยที่สุดและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ FITC-conjugated rabbit anti-human Igs สำหรับเทคนิค PSIFT คือเจือจาง 1:30 และปริมาตร 25 μL โดยสามารถแยกผลปฏิกิริยาบวกและลบได้ชัดเจน ลักษณะการติดสีเข้มเป็น 4+ และให้ผลบวกกับทุกเกร็ดเลือด เมื่อทดสอบยืนยันความจำเพาะของ FITC-conjugated rabbit anti-mouse Igs พบว่าเมื่อให้ PFA-fixed platelet suspension ทำ

ปฏิกิริยากับ anti-HLA serum จากนั้นตามด้วย unconjugated rabbit anti-human IgG ก่อนการเติมแอนติบอดีติดฉลาก พบว่าให้ผลลบ แสดงว่า unconjugated rabbit anti-human IgG เข้าจับและบดบังมิให้แอนติบอดีติดฉลากทำปฏิกิริยากับ anti-HLA ได้ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ติดฉลากทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีเท่านั้นจริงมิได้จับกับแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือดและมีผลทำให้เกิดผลบวกปลอมได้

ในการทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา พบว่าแอนติบอดีอื่นๆ ซึ่งไม่ใช่แอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือดจะไม่ทำปฏิกิริยาและให้ผลเป็นลบ เห็นได้ว่าเทคนิค PSIFT เป็นเทคนิคที่ค่อนข้างจำเพาะ ในการทดสอบความไวของเทคนิคโดยการเจือจางซีรัมที่มี anti-

ตารางที่ 7 Detection of platelet antibodies in diseases by PSIFT

Diagnosis	No. of sample	No. of positive	% of case
Acute leukemia	3	1	30
Acute lymphoblastic leukemia	7	2	29
Chronic myeloid leukemia	2	1	50
Acute myeloid leukemia	16	7	43
Aplastic anemia	7	4	57
Anemia	2	1	50
Idiopathic thrombocytopenic purpura	5	5	100
Hodgkin's disease	2	-	0
Pancytopenia	9	2	22
Lymphoma	2	1	50
Non-Hodgkin's lymphoma	5	3	60
Other	11	6	55
Not specified	13	8	62
Total	84	41	48.8

จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PSIFT 41 ราย คิดเป็น 48.8%

การตรวจยืนยันตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PSIFT จำนวน 41 ราย ด้วยวิธี lymphocytotoxicity test ให้ผลลบทั้งหมดคิดเป็น 100%

HLA ให้มีความเข้มข้นต่างๆ และทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน lymphocytotoxicity test พบว่าเทคนิค PSIFT มีความไวพอสมควรในการตรวจหาระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัม สามารถตรวจหาแอนติบอดีในปริมาณน้อยๆ ได้ ลักษณะเช่นนี้สามารถนำไปใช้ในตัวอย่างทางคลินิกได้ดีเนื่องจากในการตรวจสอบจริงนั้นมักไม่เจือจางซีรัม ยกเว้นแต่ในรายที่ให้ไตเตอร์สูง

เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ paraformaldehyde ในการตรึงผิวเกร็ดเลือดก่อนการทำปฏิกิริยา แม้จะยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดแต่สันนิษฐานได้ว่า paraformaldehyde มีส่วนในการกระตุ้น Fc receptors ซึ่งมีอยู่บนผิวเกร็ดเลือด และอีกกรณีหนึ่งคือไปจับกับบางส่วนของ adhesion molecule receptors ทำให้มีการเพิ่มประจุบนผิวเกร็ดเลือด ลักษณะดังกล่าวมีผลช่วยยับยั้งการจับของโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่จำเพาะได้ อย่างไรก็ดีตามเพื่อ

ตอบคำถามว่าสารดังกล่าวอาจมีผลทำให้เกร็ดเลือดแสดงแอนติเจนบนผิวมากขึ้น หรือในทางกลับกันอาจบดบังแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือด ซึ่งมีผลต่อระดับปฏิกิริยาและทำให้เกิดผลบวกหรือผลลบปลอมได้ จึงจำเป็นต้องพิสูจน์ว่า paraformaldehyde ไม่มีผลกระทบต่อผลดังกล่าวโดยใช้เกร็ดเลือดที่ตรึงด้วย paraformaldehyde และเกร็ดเลือดปกติ ศึกษาเปรียบเทียบกันในการดูดซับแอนติบอดีในซีรัมก่อนการทำปฏิกิริยา PSIFT ในขั้นตอนตามปกติพบว่าไม่มีความแตกต่างในระดับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในซีรัมกับแอนติเจนบนผิวเกร็ดเลือด

จะเห็นได้ว่าเทคนิค PSIFT สามารถนำมาใช้งานตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเกร็ดเลือดได้ดี เพราะมีความจำเพาะของเทคนิค ความจำเพาะของปฏิกิริยา ตลอดจนมีความไวเพียงพอ เมื่อนำเทคนิคดัง

ตารางที่ 8 Sera with antibodies detected by PSIFT were antibodies specific to platelet membrane gpIIb and/or gpIIIa by indirect ELISA

Serum No.	O.D.
1	0.350
2	0.392
3	0.860
4	1.470
5	1.224
6	1.292
7	1.459
8	1.716
9	1.463
10	1.223
11	0.675
12	1.091
13	1.871
14	2.339
15	2.698
16	1.384
17	0.661
18	1.301
19	0.954
20	1.669
21	2.338
22	1.250
23	0.390
24	0.524
25	0.370
26	2.204
27	0.487
28	0.339
29	0.540

negative control (n = 50)

Cut-off value O.D. = 0.145; conjugate control O.D. = 0.013

กล่าวทดสอบกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลือดชนิดต่างๆ ที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำ และต้องการเกร็ดเลือดเข้มข้นในการรักษา จำนวน 84 ราย พบว่าให้ผลบวกด้วยเทคนิค PSIFT 41 ราย คิดเป็น 48.8% และในจำนวนตัวอย่าง 41 รายนี้เมื่อตรวจด้วยวิธี Lymphocytotoxicity test ให้ผลลบทุกราย ซึ่งให้เห็นว่าแอนติบอดีที่พบนั้นไม่ใช่เป็นแอนติบอดีต่อโมเลกุล HLA แอนติเจน³ ซีรัมที่ให้ผลบวกสามารถพบได้ในเกือบทุกโรคยกเว้น Hodgkin's disease และที่เห็นชัดเจน คือให้ผลบวกในซีรัมผู้ป่วยทุกรายซึ่งได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) ซึ่งสามารถอธิบายการเกิดแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดได้ดังนี้ ในกรณีผู้ป่วยได้รับการรักษาภาวะเลือดออกเนื่องจากเกร็ดเลือดต่ำโดยการให้เกร็ดเลือดเข้มข้น เกร็ดเลือดที่ได้รับเข้าไปถึงแม้จะมีหมู่เลือดที่ตรงกัน แต่อาจมี platelet specific antigen (HPA) ที่แตกต่างกัน เพราะไม่มีการตรวจแยก หรือตรวจความเข้ากันได้ระหว่างเกร็ดเลือดของผู้บริจาคกับซีรัมของผู้รับ HPA ที่แตกต่างกันนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและสร้างแอนติบอดีต่อ HPA ส่งผลให้มีการต่อต้านและทำลายเกร็ดเลือดที่ได้รับในครั้งต่อไป นอกจากนี้ในกรณีผู้ป่วยที่มีภาวะแพ้ภูมิตนเอง โดยเฉพาะโรค idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) ซึ่งมีการสร้างแอนติบอดีต่อโมเลกุล GPIIb/IIIa บนผิวเกร็ดเลือด แม้จะไม่เคยได้รับการเปลี่ยนถ่ายเกร็ดเลือดเข้มข้นมาก่อน⁴ กรณีนี้ผู้ป่วยจะต่อต้านและทำลายเกร็ดเลือดที่ได้รับเข้าไปตลอดเวลา ในกรณีที่สามซึ่งผู้ป่วยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว และมะเร็งของระบบต่อมน้ำเหลือง เมื่อได้รับการรักษาด้วยยาในกลุ่ม quinine, quinidine หรือ heparin ยาเหล่านี้เมื่อเข้าสู่กระแสเลือด จะสามารถจับกับโปรตีนในพลาสมาและถูกตรึงอยู่บนผิวเกร็ดเลือด^{1, 5} ลักษณะดังกล่าวกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและมีผลทำลายเกร็ดเลือดเมื่อมีแอนติบอดีจับและเกิดการตรึงคอมพลีเมนต์

เนื่องจากบนผิวเกร็ดเลือดมี glycoprotein เป็นส่วน

ประกอบถึง 5% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด และ glycoprotein ชนิดที่พบมากที่สุดถึง 50% คือ GPIIb/IIIa บนโมเลกุลดังกล่าวมีตำแหน่งที่แสดงคุณสมบัติเป็นแอนติเจนของ platelet specific antigen ได้แก่ HPA-1a, HPA-1b และ HPA-3a, HPA-3b¹ เพื่อศึกษาว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบในซีรัมผู้ป่วยจะเป็นแอนติบอดีต่อโมเลกุลดังกล่าวด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าในซีรัมที่นำมาทดสอบจำนวน 29 รายที่ยังมีปริมาณซีรัมเพียงพอให้ทดสอบ จากจำนวนทั้งหมด 41 รายที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PSIFT ต่างให้ผลบวกด้วยวิธี indirect ELISA โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในขนาดต่างๆ กัน แสดงให้เห็นว่าในซีรัมที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PSIFT นั้นมีแอนติบอดีต่อโมเลกุลบนผิวเกร็ดเลือด และเป็นแอนติบอดีต่อโมเลกุล GPIIb/IIIa, platelet specific antigen และ/หรือตำแหน่งใด ๆ บนโมเลกุลดังกล่าว แต่ไม่ใช่แอนติบอดีต่อโมเลกุล HLA แอนติเจนแน่นอน แม้ว่าวิธีการตรวจดังกล่าวจะไม่ใช่วิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ แต่ได้ทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่าแอนติบอดีที่พบในซีรัมผู้ป่วยและให้ผลบวกด้วยวิธี PSIFT นั้นเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับโมเลกุลบนผิวเกร็ดเลือดจริง

สรุป

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า PSIFT สามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดได้ในระดับหนึ่ง เพื่อช่วยการวินิจฉัย ช่วยการพิจารณาให้การรักษาและหากจำเป็นสามารถใช้ในการตรวจความเข้ากันได้ของเกร็ดเลือดระหว่างซีรัมของผู้รับกับเกร็ดเลือดของผู้บริจาค เพื่อลดปัญหาการต่อต้านเกร็ดเลือด เนื่องจากในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยังไม่มีบริการตรวจสอบมาตรฐานสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือด ดังนั้นจึงไม่ได้มีการเปรียบเทียบวิธีการนี้กับวิธีมาตรฐานใดๆ และวัตถุประสงค์ก็เพียงเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นการตรวจสอบพิเศษในบางกรณีเท่านั้น อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้ก็เป็นเพียงการศึกษา

เบื้องต้นเท่านั้น ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมและเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ถึงข้อดี ข้อเสียและความสามารถในการทำได้ในห้องปฏิบัติการ วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดวิธีอื่นอีกหลายวิธีที่ทำได้ง่าย และสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเช่น monoclonal antibody immobilization of platelet antibodies (MAIPA) เป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมด้วยได้เป็นอย่างดี เพื่อตรวจหาความจำเพาะของแอนติบอดี อย่างไรก็ตามวิธีหลังนี้จำเป็นต้องอาศัยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุลหลายชนิดบนผิวเกร็ดเลือด ซึ่งขณะนี้ผู้วิจัยได้ผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ดังกล่าว และมีความตั้งใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดในซีรัมของผู้ป่วยภาวะเลือดออกโดยตลอดจนผู้ป่วยที่มีภาวะเกร็ดเลือดต่ำไม่ทราบสาเหตุต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์นายแพทย์นิเวศน์ นันทจิต และนายบุญธรรม กันตวิรงค์ ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยสำหรับใช้ในการศึกษารังนี้ อาจารย์ลัดดา พงษ์สถิตยกุล ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ anti-HLA antibody สภาวิชาชีพไทยที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ anti-platelet antibody

เอกสารอ้างอิง

1. Kunicki JT, George NJ. *Platelet Immunology, molecular and clinical aspects*. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1989.
2. ปัญจะ กุลพงษ์, ไชยโรจน์ แสงอุดม. ใน : มงคล โชติยาภรณ์, ณัฐจิรา อินตะโส, ธวัช โตสิตรัตน์, บรรณการ. คู่มือปฏิบัติการโลหิตวิทยา. เชียงใหม่: ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2543.
3. Borne DV, Verheugt FWA, Oosterhof F. A Simple Immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol* 1995;39:195-207.
4. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Glycoprotein IIb/IIIa autoantigenic repertoire in chronic

idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1995;91:971-5.

5. วิชัย ประยูรวิวัฒน์. Thrombocytosis and thrombocytothemia. ใน : ถนอมศรี ศรีชัยกุล, แสงสุรีย์ จูฑา, บรรณาธิการ.

ตำราโลหิตวิทยา : การวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: บริษัทเมดิคอลมีเดีย จำกัด, 2537:336-84.

Detection of Platelet Antibodies by Platelet Suspension Immunofluorescent Technique

Preeyanat Wongchan, and Duriya Phongmul

Department of Clinical Immunology, Faculty of Medical Technology, Changmai University

Abstract: There is an urgent need for a simple and reliable method for the detection of platelet antibodies, comparable to the antiglobulin test in red cell serology, for better investigation, following up and monitoring the diseases in patients suffering from bleeding disorder effected from thrombocytopenia. In order to develop and demonstrate that platelet suspension immunofluorescent test (PSIFT) is sufficient for the detection of platelet-reactive alloantibodies, 84 serum sample of patients suffering from hematologic malignancies, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) with platelet transfusion therapy from the Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were tested. The optimal condition of FITC-conjugated rabbit anti-human immunoglobulins was titrated and the result was 1:30 and 25 (L for dilution and volume, respectively). In addition, the specificity, sensitivity and reproducibility were also studied. It was shown that all results were acceptable. The detection of anti-human platelet antibodies in serum of patients with diseases mentioned above resulted in 48.8% positive. To exclude that such those were not antibodies specific to HLA class I molecules, lymphocytotoxicity test was performed. The results showed they were all negative. This result indicated that antibodies were specific to platelet membrane antigens. Furthermore, the positive serum were determined to specify whether there was anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa and/or platelet specific antigens by an indirect ELISA. It was found that they were all significantly positive.

Key Words : ● PSIFT ● HLA class I ● Platelet glycoprotein IIb/IIIa

Thai J Hematol Transf Med 2001;11:73-83.

