บทบรรณาธิการ

Techniques for Human Platelet Alloantigens Antibodies Testing

รัชนี โอเจริญ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เกร็ดเลือดหรือ platelet เป็น cellular component ที่สำคัญไม่น้อยไปกว่าเม็ดเลือดแดงหรือเม็ดเลือดขาว antibodies ต่อ human platelet alloantigens (HPA) หรือ isoantigens ทำให้เกิดสภาวะการเจ็บป่วยหรือโรคที่รุนแรงได้ เช่น neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAITP), post-transfusion purpura (PTP)และ refractoriness to platelet transfusion (PTR) นอกจากนั้นยังเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและศึกษาประชากรของโลก รวมทั้งพบว่าความแตกต่างของ HPA เช่น HPA -5 อาจเป็นสาเหตุให้เกิด acute rejection หรือ GVHD ใน un-related bone marrow transplant อย่างไรก็ตามเทคนิคการตรวจหรือ typing HPA ทางด้าน serology ได้ผลการตรวจที่ไม่ไวและจำเพาะเจาะจง เทคนิคการตรวจทาง DNA เป็นความหวังใหม่ โดยในปี ค.ศ. 1979 Kunickl & Aster ได้พบว่า HPA จะอยู่ใน glycoprotein (GP) ซึ่งอยู่ที่ surface membrane ของ platelet ในปี ค.ศ. 1987 Fitzerald และคณะได้พบ DNA sequence ของ glycoprotein III a เป็นจุดเริ่มต้นทำให้นักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านสามารถตรวจพบ DNA sequence ของ HPA ระบบต่างๆ อันนำไปสู่การตรวจ HPA โดยเทคนิค DNA sequence

การตรวจ HPA ทาง serology เป็นการตรวจที่จะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ เพราะนอกจาก platelet จะมี ABH antigen, HLA class I antigen แล้ว platelet อาจ adsorb เอา nonreactive substance ไว้ รวมทั้ง platelet ยังมี immunoglobulin Fc recepters ซึ่งจะ bind กับ denatured immunoglobulins และ non-specific antigen-antibody complexes ทำให้เกิด false positive reaction ได้ นอกจากนั้นถ้าใน serum samples มี HLA antibodies อยู่ด้วย การอ่านและแปลผลจะยิ่งยุ่งยากมากขึ้น HPA ตัวแรกที่พบคือ Zw ซึ่ง van Loghem และคณะ ได้รายงานไว้ใน ค.ศ. 1959 ต่อมาในปี ค.ศ. 1961 van der Weerdt และคณะรายงาน HPA ตัวที่สองคือ Ko ซึ่งทั้ง 2 ท่าน ได้ใช้เทคนิคการตรวจโดย platelet agglutination test ต่อมา Shulman และคณะรายงานการตรวจพบ anti PLA1 โดยเทคนิค platelet complement fixation testอย่างไรก็ตามทั้งเทคนิคการตรวจโดยวิธี agglutinationtest หรือ complement fixation test ยังไม่ไวและจำเพาะเพียงพอ ในปี ค.ศ. 1978 von dem Borne และคณะ ได้พบเทคนิคการตรวจ HPA โดยวิธี platelet suspension immunofluorescence test (PSIFT) ซึ่งโดยใช้เทคนิค PSIFT นี้ ในปี ค.ศ. 1980 เขาก็ได้รายงาน HPA ตัวที่ 3 คือ Baka ต่อมา Shibata และคณะ ได้รายงานการพัฒนาเทคนิคการตรวจ HPA ใหม่ คือ mixed passive hemagglutination test

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 13 ตุลาคม 2543 และให้ตีพิมพ์ 16 ตุลาคม 2543
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.รัชนี โอเจริญ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10310

(MPHA)และในปี ค.ศ. 1981 ได้รายงานการตรวจพบ HPA ตัวที่ 4 คือ Yuka/Yukb

รายงานการตรวจพบ HPA ตัวใหม่ๆ จากประเทศต่างๆ มีเพิ่มเติมมากขึ้น บางตัวอาจจะเป็น antigen หรือ antibody ตัวเดียวกันแต่มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ซึ่งส่วนใหญ่จะตั้งชื่อเรียกตามชื่อผู้ป่วย ต่อมา International Society of Blood Transfusion (ISBT) ได้จัดประชุม Platelet Serology Workshop เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 ต่อด้วยการประชุมของ ISBT Expert panel on Platelet Serology ที่กรุง Budapest ในปี ค.ศ. 1982, Munich (1984), Sydney (1986), London (1988), Los Angeles (1990), Anaheim (1992), Amsterdam (1994), Makuhari (1996), Oslo (1998) ทำให้การเรียก alloantigens ตัวเดียวกันแต่มีชื่อแตกต่างกันสามารถเรียกให้เป็นตัวเดียวกันเป็นระบบของ Human Platelet Antigens (HPA) ซึ่งในปัจจุบันสามารถจัดเป็นระบบได้ 13 ระบบ คือ HPA 1-13 แต่ละระบบจะมี gene 2 ตัว อยู่เป็นคู่ (biallelic gene) ยีนที่พบบ่อยกว่าเป็น a และยีนที่พบน้อยกว่าเป็น b ในขณะเดียวกันจากผลการตรวจทางด้าน DNA จะพบว่าความสัมพันธ์หรือตำแหน่งของ HPA แต่ละระบบกับ GP เช่น GP III a จะพบ HPA1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, GPIb จะพบ HPA -2, 12 GPIIb จะพบ HPA -3, 9 และ GPIa จะพบ HPA -5, 13

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาถึง frequency ของ HPA ระบบต่างๆ ในประชากรของคนไทยเปรียบเทียบกับชาติอื่นๆ รายงานจากรัชนี โอเจริญและคณะ เรื่อง Human Platelet-specific Alloantigens : Phenotype Frequency in Thai Blood Donors ในวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2536 ซึ่งพบว่า phenotype frequencies ของ HPA -1a 100%, HPA - 2b 12.5%, HPA - 3a 66.6%, HPA-4b 0% และ HPA - 4a 100% ซึ่งใกล้เคียงกับ frequency ของประชากรในชาติเอเชียอื่นๆ เช่น ญี่ปุ่นและเกาหลี ล่าสุดอมรรัตน์ ร่มพฤกษ์ และคณะจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้เสนอผลงาน (oral presentation) เรื่อง Genotyping of human platelet antigens in ethnic Northeast Thais by the polymerase chain reaction sequence specific primer technique ของ HPA ในการประชุมประจำปีของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2543 ซึ่งพบว่าในประชากร 300 คน ที่ศึกษาได้ผล phenotype frequencies 100% ของ HPA -1a, 4a, 5a, 6a, สำหรับ HPA -1b, 2a, 3a, 3b, 5b และ 6b พบ phenotype frequencies เป็น 5.7, 99.7, 12.3, 78.0, 71.3, 7.3 และ 3.0% ตามลำดับ ซึ่งทำให้พอจะคาดเดาได้ว่า HPA 1a, 4a, 5a, 6a จะไม่เป็นปัญหาทางด้านคลินิก เนื่องจากทุกคนจะมีแอนติเจนเป็นบวก

ในการตรวจ HPA และแอนติบอดีย์ในทาง serologyวิธีการตรวจโดยใช้เทคนิค MPHA ของ Dr. Shibata เป็นวิธีที่ง่าย โดยใช้ platelet ทั้งเซลล์เป็น antigen โดยแยก platelet จาก EDTA whole blood ปรับให้ได้จำนวนเซลล์ 5 x 10^8/mL แล้วหยด platelet suspension 1-2 หยด ใน U-bottom microtitre plate ปั่น plate ให้ platelet ลงไปอยู่ในก้นหลุมให้เป็น monolayer เติม serum 1 หยด incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที แล้วเติม indicator red cell ปั่น plate อีกครั้งแล้วดูปฏิกิริยา ด้วยตาเปล่า ถ้าผลบวกจะเห็นเม็ดเลือดแดงแผ่กระจายอยู่ที่ก้นหลุม ถ้าผลลบจะเห็นเม็ดเลือดแดงตกลงที่ก้นหลุมเป็นเม็ดกระดุม เทคนิค MPHA นี้เป็นเทคนิคที่ง่ายเหมาะที่จะใช้ในการตรวจในลักษณะเป็นการตรวจทางด้านบริการแก่แพทย์และผู้ป่วย แต่ในการใช้ platelet ทั้งเซลล์ ทำให้มีข้อจำกัดหลายประการ

1. Platelet suspension และ serum ที่จะทำการตรวจต้องมี ABO blood group ตรงกัน เนื่องจาก platelet จะมี ABH substance อยู่

2. ถ้าใน serum มี anti HLA ที่ตรงกับ HLA class I antigen ของ platelet การตรวจนั้นจะให้ผลบวกเช่นเดียวกัน

3. ปฏิกิริยาที่บวกอาจเกิดจากมี anti HLA, มี anti HLA ร่วมกัน anti HPA หรือมี anti HPA อย่างเดียว ซึ่งต้องทำการตรวจสอบเพิ่มเติมโดยใช้ platelet ที่ treat ด้วย chloroquine ซึ่งจะเป็นการกำจัด HLA antigen และทำให้สามารถแยกได้ชัดเจนว่าเป็น antibody ชนิดใด

ในผู้ป่วยเด็กแรกคลอดที่เกิดสภาวะ NAITP เกิดจากแม่สร้าง anti HPA ที่ได้รับการ immunize จากลูก ในกรณีอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PTR จะเกิดในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับเลือดหรือ platelet บ่อยๆ ฝ่ายปฏิบัติการร่วมกับองค์การอนามัยโลก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้บริการการตรวจกรองและตรวจหาชนิดของแอนติบอดีย์ (HLA, HPA) ในผู้ป่วยที่สงสัยเป็น NAITP, PTP และ PTR โดยเทคนิค MPHA ในกรณีของ PTR ถ้าผู้ป่วยจำเป็นต้องใช้ platelet ในการรักษาทางศูนย์บริการโลหิตฯ จะตามผู้บริจาคโลหิตที่มี HLA matched HLA x-match หรือ x-match ด้วย chloroguine treated MPHA ซึ่งเมื่อได้ผู้บริจาคที่เข้าได้กับผู้ป่วยแล้ว จะเก็บ platelet concentrate ด้วยวิธี apheresis พร้อมทั้ง leukocyte depleted เพื่อป้องกันการกระตุ้นเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. *Fitzgerald LA. Steiner B, Rall SC Jr. LO SS. Phillips DR. Protein sequence of endothelial glycoprotein III a derived from a cDNA clone. Identify with platelet glycorotein III a and similarity to "integrin" J. Biol Chem 1987;262:3936-9.*
2. *Loghem JJ van, Dorf meijer H. Hart M van der, Schreuder F. Serological and genetical studies on Platelet antigen (Zw). Vox Somg 1959;4:161-9.*
3. *van der Weerdt ChM, van de Wiel ThWM , Dorpmeiyer H, Engelfriez CP, van Loghem JJ. A new platelet antigen, Proceedings of the 8th Congress of the European Society of Haematology, Wien 1961; Basel/ New York : Karger, 1961:379*
4. *Shulman NR, Aster RH, Leiner A, Hiller MC. A new syndrome of post transfusion.*
5. *von dem Borne AEGK, et al. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 1978;39:195-207.*
6. *Shibata Y, Juji T, Nishigawa Y, Sakamoto H, Ozawa N. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. Vox Sang 1981;41:25-31.*
7. *Shibata Y, Miyaji T, Ichikawa Y, Matsuda I. A new platelet antigen system. Yuka/Yukb. Vox Sang 1986; 51:334-6.*
8. *Teramura G, Slichter SJ. Report on the sixth international society of blood transfusion platelet serology workshop. Transfusion 1996;36:75-81.*
9. *Shows TB, et al. Guidelines for human gene nomenclature. An international system for human gene nomenclature. (ISGN, 1987). Cytogenet Cell Genet 1987;46:12-28.*
10. *รัชนี โอเจริญ, ภาวิณี คุปตวินทุ, นลินี จิตจักร์. Human platelet - specific alloantigens phenotype frequency in Thai Blood Donor: Preliminary report วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2536;3:1-27-35.*
11. *Amornrat V, Romphruk et al. Genotyping of human platelet antigens in ethnic Northeast Thais by the pohymerase chain reaction - sequence specific primer technique (oral presentation) : การประชุมประจำปีศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กุมภาพันธ์ 2543.*

โทษผู้อื่น แลเห็น เป็นภูเขา
โทษของเรา แลไม่เห็น เท่าเส้นขน
ตดคนอื่น เหม็นเบื่อ เราเหลือทน
ตดของตน ถึงเหม็น ไม่เป็นไร

อันบ้านเรือน ใหญ่โต รโหฐาน
มีเสาทาน หลายต้น จึงทนไหว
เกิดเป็นคน อยู่เดียว ก็เปลี่ยวใจ
ต้องอาศัย พวกพ้อง พี่น้องนา

จะหาใคร เหมาะใจ ที่ไหนเล่า
ตัวของเรา ยังไม่ เหมาะใจหนา
อนิจจัง ทุกข์ยัง อนัตตา
รู้ล่วงหน้า เสียก่อน ไม่ร้อนใจ

ทุกข์สุขอยู่ ที่ใจ มิใช่หรือ
ถ้าใจถือ ก็เป็นทุกข์ ไม่สุขใส
ถ้าไม่ถือ ก็เป็นสุข ไม่ทุกข์ใจ
เราอยากได้ ความทุกข์ หรือสุขนา

(พระศาสนโสภณ)