

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาแอนติบอดีต่อเกร็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีปัญหาเกร็ดเลือดต่ำ

ภาวิณี คุปตวิณฑุ, นลินี จิตจักร, สุกานดา แซ่หลี่, รัชณี โอเจริญ และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง*

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330, *ภาควิชาพยาธิวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

บทคัดย่อ: การศึกษาในเลือดผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำ ที่ส่งมาตรวจยังฝ่ายห้องปฏิบัติการร่วมกับองค์การอนามัยโลก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติตั้งแต่ มิถุนายน 2536 ถึง ธันวาคม 2542 จำนวน 163 ราย พบว่า มีสาเหตุจาก non-alloimmune 44.18% และ alloimmune 55.82% การเกิด alloimmune พบได้บ่อยในผู้ป่วยกลุ่ม myeloproliferative disorders (33.12%) และผู้ป่วย platelet ต่ำที่ไม่ระบุสาเหตุ (9.2%) แอนติบอดีของ alloimmune ที่พบมากที่สุดคือ HLA antibodies (49.69%) และพบ HPA antibodies (6.13%) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้เป็น HPA - 5b (1.23%), HPA - 2b (1.23%), HPA - 3a (0.61%), Nak^a (0.61%) และ unidentified antibody (2.45%) ดังนั้นในผู้ป่วยที่มี platelet ต่ำ ควรคัดเลือก HLA matched platelet ร่วมกับการให้ส่วนประกอบของเลือดที่เป็น leukocyte reduced เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาการเกิด platelet refractoriness

Key Words: ● Platelet antibody ● Thrombocytopenic patients

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543;10:123-7.

เป็นที่ทราบกันดีว่า ผู้ป่วยที่ได้รับ platelet transfusion บ่อยๆ อาจเกิดปัญหาไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย platelet transfusion (platelet refractoriness) โดยค่า corrected count increment (CCI) ที่ 1 ชั่วโมงต่ำกว่า 7,500 เซลล์ต่อไมโครลิตร หรือมี poor platelet response¹ ซึ่งเกิดจากสาเหตุได้หลายประการทั้งชนิด alloimmune และ non-alloimmune สาเหตุจาก non-alloimmune ได้แก่ อาการไข้จากการติดเชื้อ การสร้างแอนติบอดีต่อยาปฏิชีวนะ และปัญหาของ autoim-

mune ส่วนสาเหตุจาก alloimmune นั้นอาจเกิดจาก HLA alloimmunization platelet alloantibodies และแอนติบอดีของหมู่เลือด ABO ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนบนผิว platelet นั้นมีทั้ง common alloantigens ซึ่งอาจพบร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดแดง และ เนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ABH, Lewis, I, P และ HLA class I antigen และแอนติเจนที่พบเฉพาะบนผิว platelet ซึ่งเรียกว่า human platelet antigen (HPA)²

ทางห้องปฏิบัติการร่วมกับองค์การอนามัยโลก ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้ทำการตรวจ platelet specific antigen ในผู้ป่วยบริจาคพลาสมา 132 คน และได้คัดเลือกไว้เป็น panel cell เพื่อทำการตรวจแยกชนิดของแอนติ-

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 10 กันยายน 2543 และให้ตีพิมพ์ 21 ตุลาคม 2543
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ น.ส.ภาวิณี คุปตวิณฑุ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บอดิตต่อ platelet ในผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำ ตั้งแต่ พ.ศ. 2536³ และได้ให้บริการตรวจกรองหาแอนติบอดิตต่อ platelet และตรวจ platelet crossmatch ในผู้ป่วยที่ได้รับเลือด และส่วนประกอบของเลือดบ่อยครั้ง เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคเลือด เป็นต้น เพื่อช่วยในการคัดเลือกผู้บริจาค single donor platelet ที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของชนิดของแอนติบอดิตที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำ เนื่องจากยังไม่มีรายงานสาเหตุที่ทำให้เกิด platelet ต่ำในผู้ป่วยคนไทย และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแอนติบอดิตกับการวินิจฉัยโรค

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มศึกษาคือผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2536 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2542 จำนวน 163 ราย เพศชาย 76 ราย เพศหญิง 174 ราย ช่วงอายุตั้งแต่ 2 วัน ถึง 82 ปี (อายุเฉลี่ย 34.3 ปี) โดยใช้เลือดชนิด clotted blood 10 มล. นำมาปั่นแยกซีรัมเพื่อนำมาทดสอบหาแอนติบอดิตต่อ platelet ด้วยวิธี solid phase red cell adherence assay (SPRCA)⁴ โดยทดสอบกับ platelet panel cells จำนวน 6 ราย ที่ทราบชนิดของแอนติเจนของ platelet แล้ว ดังตารางที่

1 ในกรณีที่แยกชนิดของแอนติบอดิตระหว่าง HLA และ platelet specific จะใช้เทคนิคของ chloroquine treated platelets เพื่อกำจัดแอนติเจนของ HLA บนผิว platelet ออกก่อนทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง

วิธีการทดสอบแอนติบอดิตต่อ platelet (SPRCA)⁴

เตรียม platelet suspension โดยละลาย platelet rich plasma ที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ. นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ปั่นล้างด้วยสารละลาย 0.9% NaCl กับ 0.5% albumin 2 ครั้ง fix ด้วย 1% paraformaldehyde ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 1×10^8 เซลล์/มล. ในกรณีที่เตรียม chloroquine treated platelet หลังจากปั่นล้าง platelet ด้วยสารละลาย 0.9% NaCl และ 0.5% albumin เติม 0.2 M chloroquine 1.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้ว fix ด้วย 1% paraformaldehyde และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 1×10^8 เซลล์/มล.

เตรียม indicator cells โดย sensitized เม็ดเลือดแดง หมู่โลหิต O Rh+ ชนิด R₁r ด้วย human anti D (IgG) ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที ปั่นล้างด้วย สารละลาย 0.9% NaCl ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 5% ด้วยน้ำยา Alsever โดย sensitized cells ที่นำมาใช้เป็น indicator cells ควรได้ผล direct antiglobulin test ประมาณ 1+

ตารางที่ 1 Panel cells ของ platelet antigen ที่ใช้ในการทดสอบ

Panel cell		Antigen					
No.	HPA-1a	HPA-2b	HPA-3a	HPA-4a	HPA-4b	HPA-5b	Nak ^a
1	+	0	+	+	0	0	+
2	+	+	+	+	0	0	+
3	+	0	0	+	0	0	+
4	+	0	0	+	0	0	+
5	+	+	+	+	0	+	+
6	+	+	0	+	0	0	+

วิธีทำ SPRCA⁴

นำไมโครเพลทรูปถ้วย (microtiter U plate) ที่เคลือบด้วย antithrombocyte ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย PBS และ 0.5% albumin หยด platelet suspension ลงในแต่ละหลุมๆ ละ 2 หยด นำ plate ไปปั่นที่ 1,700 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เคาะ supernatant ออก incubate plate ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 15 นาที ครบเวลาล้าง platelet ส่วนเกินออกด้วยสารละลาย PBS และ 0.5% albumin เติม glycine 100 ไมโครลิตร และซีรัมที่ต้องการทดสอบ 50 ไมโครลิตร แล้ว incubate plate ที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 15 นาที ครบเวลาล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย PBS และ 0.5% albumin เติม antihuman IgG (Fc specific) 50 ไมโครลิตร และเติม indicator cells 50 ไมโครลิตร (ปรับความเข้มข้นเป็น 0.2% ในน้ำยา Alsever) ปั่น plate ที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที อ่านผลดูปฏิกิริยาการแผ่กระจายของเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลุม อ่านผลบวกเมื่อเห็นการกระจายของเม็ดเลือดแดงเต็มก้นหลุม และอ่านผลลบเมื่อเห็นเม็ดเลือดแดงตกลงเป็นเม็ดกระจุก

ผลการศึกษา

การศึกษาย้อนหลังในผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำจำนวน 163 ราย พบว่ามีสาเหตุจาก non-alloimmune 72 ราย (44.17%) และสาเหตุจาก alloimmune 91 ราย (55.82%) แบ่งเป็น HLA antibodies 81 ราย (49.69%) HPA antibodies 2 ราย (1.23%) และเกิดจาก HLA ร่วมกับ HPA antibodies 8 ราย (4.90%) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ในกลุ่ม non-alloimmune พบสาเหตุจาก autoantibody จำนวน 21 ราย (12.89%) และไม่ทราบสาเหตุ 51 ราย (31.29%)

การศึกษานิดของ HPA antibody พบว่าในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มี platelet ต่ำ พบ anti-HPA-2b (Sib^a) 1 ราย (0.61%) และ anti-Nak^a 1 ราย (0.61%) ในกลุ่มผู้ป่วยอื่นๆ ที่มีปัญหา platelet ต่ำ พบ anti-HPA-5b (Br^a) 2 ราย (1.22%) anti-HPA-2b (Sib^a) 1 ราย (0.61%) anti-HPA-3a (Bak^a) 1 ราย (0.61%) และ unidentified 4 ราย (2.44%) ตามลำดับ

เมื่อได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแอนติบอดีกับการวินิจฉัยโรค พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการวินิจฉัยโรคเป็น myeloproliferative disorders 86 ราย

ตารางที่ 2 ชนิดของแอนติบอดี ที่ตรวจพบในผู้ป่วย 163 ราย

Disease	Antibody (%)					Total
	Negative	Auto antibody	HLA	HPA	HLA+HPA	
Myeloproliferative disorders	13.50	6.15	28.83	0.00	4.29	52.77
ITP	0.61	0.61	1.23	0.00	0.00	2.45
Unidentified caused-Thrombocytopenia	9.20	1.23	7.97	1.23	0.00	19.63
Thalassemia	0.00	0.00	0.61	0.00	0.00	0.61
SLE	0.62	0.61	0.61	0.00	0.00	1.84
CA+tumor	1.84	0.61	4.30	0.00	0.00	6.75
Other diseases	5.52	3.68	6.14	0.00	0.61	15.95
Total	31.29	12.89	49.69	1.23	4.90	100.00

(52.77%) idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) 4 ราย (2.45%) ผู้ป่วยที่มี platelet ต่ำที่ไม่ระบุสาเหตุ 32 ราย (19.63%) thalassemia 1 ราย (0.61%) SLE 3 ราย (1.84%) เนื้องอก และมะเร็ง 11 ราย (6.75%) และโรคอื่นๆ 26 ราย (15.95%) ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับผู้ป่วยกลุ่ม myeloproliferative disorders ประกอบด้วย leukemia 48 ราย (29.45%) aplastic anemia 20 ราย (12.27%) lymphoma 13 ราย (7.98%) และ MDS 5 ราย (3.07%) ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่มี platelet ต่ำที่ไม่ระบุสาเหตุแยกตามการวินิจฉัยโรคได้เป็น เด็กแรกเกิด 8 ราย (4.91%) และผู้ป่วยอื่น 24 ราย (14.72%)

วิจารณ์

การศึกษานี้พบว่า สาเหตุส่วนใหญ่ของปัญหา platelet ต่ำ ในผู้ป่วยที่ต้องได้รับเลือด หรือเกร็ดเลือด เป็นประจำเกิดจาก alloimmune 55.82% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในต่างประเทศที่พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับเลือดบ่อย จะมีโอกาสสร้าง alloimmune antibody ได้ตั้งแต่ 15-70%¹ โดยจากการศึกษานี้พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการสร้าง HLA antibody สูงถึง 49.69% ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนของ HLA มีคุณสมบัติเป็น high immunogenic ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้มากกว่าแอนติเจนชนิดอื่นๆ จากที่มีผู้รายงานไว้พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับเลือดบ่อย มีโอกาสจะสร้างแอนติบอดีต่อ HLA 10-71% แต่ถ้าผู้ป่วยได้รับเลือด และส่วนประกอบของเลือดที่มีเม็ดเลือดขาวเจือปนน้อย (leukocyte-reduced) การสร้างแอนติบอดีจะลดลงเหลือเพียง 17-21% แต่ถ้าผู้ป่วยได้รับเลือด ที่เป็น prestorage leukocyte-reduced จะตรวจพบ HLA antibody เพียง 2.7%^{1,2,5,6}

นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยมีการสร้างแอนติบอดีต่อ platelet 1.23% และแอนติบอดีต่อ platelet ร่วมกับ HLA antibody 4.90% ซึ่งใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้^{1,6}

แต่ชนิดของแอนติบอดีต่อ platelet ที่ตรวจพบจะแตกต่างกับรายงานของต่างประเทศ คือไม่พบ anti-HPA-1a เลย เนื่องจาก phenotypic frequency ของ HPA-1a ในคนไทยสูงถึง 100%^{3,7} แอนติบอดีที่ตรวจพบในการศึกษานี้ได้แก่ anti-HPA-2b (Sib^a), anti-HPA-3a (Bak^a), anti-HPA-5b (Br^a) และ anti-Nak^a ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่พบบ่อยในคนไทย⁸

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแอนติบอดีกับการวินิจฉัยโรค พบว่า การสร้างแอนติบอดีทั้งชนิดที่เป็น alloimmune และ non-alloimmune พบได้สูงในผู้ป่วยกลุ่ม myeloproliferative disorders และผู้ป่วยที่มีปัญหา platelet ต่ำ ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับเลือด และส่วนประกอบของเลือดบ่อยครั้ง ดังนั้นการใช้ส่วนประกอบของเลือดชนิดที่เป็น leukocyte-reduced จะช่วยลดการสร้างแอนติบอดี แต่ในกรณีนี้ที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีแล้ว ควรเลือกใช้ platelet ที่มีแอนติเจนในระบบ HLA เข้ากันได้กับผู้ป่วย (HLA matched platelet) ร่วมกับการทำ platelet crossmatch เพื่อเป็นการป้องกัน และลดการเกิด platelet refractoriness

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องรับบริจาคพลาสมา และผลิตภัณฑ์โลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างโลหิต และประสานงานการจัดหา HLA matched single donor platelet

เอกสารอ้างอิง

1. Kekomaki R. Use of HLA- and HPA- match platelets in alloimmunized patients. *Vox Sang* 1998;74(Suppl2):359-63.
2. Novotny VMJ. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang* 1999;76:1-13.
3. รัชนี โอเจริญ, ภาวิณี คุปตวินทุ, นลินี จิตจักร. Human platelet-specific alloantigens: phenotype frequency in Thai blood donors: preliminary report. วารสารโลหิตวิทยา

- และเวชศาสตร์บริการโลหิต 2536;3:27-35.
4. Lown JAG, Ivey JG. Evaluation of a solid phase red cell adherence technique for platelet antibody screening. *Transfusion Med* 1991;1:163-7.
 5. Taaning E, Simongen AC, Hjalms E, et al. Platelet alloimmunization after transfusion. *Vox Sang* 1997; 72:238-41.
 6. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, et al. Frequency and cause of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol* 1997;74:185-9.
 7. Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk A, et al. Frequency of human platelet antigen among blood donors in northeastern Thailand. *Transfusion* 1995;35: 868-70.
 8. Juji T, Saji H, Satake M, et al. Typing for human platelet alloantigens. *Immunogenetics* 1999;1:239-54.

The Incidence of Platelet Antibody in Thrombocytopenic Patients

Pawinee Kupatawintu, Naline Jitjak, Sukanda Saelee, Rachanee O-Charoen,
and Oytip Nathalang*

National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, *Department of Pathology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok, Thailand

Abstract: In a retrospective study of 163 thrombocytopenic patients who were tested for platelet antibody at the Reference Laboratory, in Co-Operation with the WHO, National Blood Centre, Thai Red Cross Society from June 1993 to December 1999. Alloimmune factors totalled 55.82% which developed most frequently in 33.12% of the patients with myeloproliferative disorders and in 9.2% for thrombocytopenic patients with unidentified causes. HLA antibodies were detected in 49.69% of the patients while HPA antibodies were detected in only 6.13% of the patients. Among them, the HPA antibodies were HPA - 5b (1.23%), HPA - 2b (1.23%), HPA - 3a (0.61%), Nak^a (0.61%) and unidentified antibodies (2.45%). In conclusion, in order to prevent platelet refractoriness, it is necessary to select HLA matched platelets as well as provide leukocyte reduced blood products to thrombocytopenic patients.

Key Words: ● Platelet antibody ● Thrombocytopenic patients

Thai J Hematol Transf Med 2000;10:123-7.

มองตน

โลกภายนอก	กว้างไกล	ใครๆ รู้
โลกภายใน	ลึกซึ้งอยู่	รู้บ้างไหม
จะมองโลก	ภายนอก	มองออกไป
จะมองโลก	ภายใน	ให้มองตน