

บทความพิเศษ

การทดสอบแอนติบอดีต่อ HLA ในผู้ป่วยก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต

ดวงตะวัน ธรรมาณิชานท์

ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

แอนติบอดีต่อ human leukocyte antigen (HLA) เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการรอดของไตที่ได้รับการปลูกถ่าย การที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HLA ของผู้บริจาค (donor-specific HLA antibody, DSA) ก่อนที่จะได้รับการปลูกถ่ายไตนั้นเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด antibody-mediated rejection และการสูญเสียไต¹⁻⁴ อย่างไรก็ตาม DSA ที่ตรวจพบในผู้ป่วยทุกรายไม่ได้มีความสำคัญทางคลินิกเท่าเทียมกันหมด ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์แอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA โดยใช้เทคโนโลยี multiplex fluorescence-based solid phase immunoassay (Luminex assay) ร่วมกับการใช้ single antigen bead ในการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ HLA ที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อจำกัด คือ สามารถเกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอมได้ ซึ่งอาจเกิดจากความหลากหลายในแง่ของขนาด รูปร่าง และการเรียงตัวของแอนติเจน HLA บน microparticle bead ซึ่งผู้ใช้ควรทราบถึงข้อจำกัดในการแปลผลการทดสอบ เพื่อที่จะได้ประโยชน์สูงสุดในการนำผลไปใช้ในทางคลินิก

ในบทความพิเศษนี้ ส่วนแรกของเนื้อหาจะกล่าวถึงหลักการข้อพึงรู้ทางเทคนิคของการทดสอบหาแอนติบอดีต่อ HLA ด้วยวิธี Luminex และต่อมาจะกล่าวถึงการนำข้อมูลแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ไปใช้ในการระบุ unacceptable antigen ในผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไต

Multiplex solid phase immunoassay (Luminex assay)

หลักการตรวจวิเคราะห์

ในปัจจุบัน multiplex solid phase immunoassay (Luminex assay) เป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ HLA เป็นอย่างมาก ในประเทศไทยเอง ห้องปฏิบัติการ HLA ที่ให้บริการตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ก็ใช้เทคโนโลยีนี้ในการตรวจทุกห้องปฏิบัติการ ดังนั้นบทความนี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะเทคนิค Luminex assay ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA

Luminex assay คือ การทดสอบโดยใช้ microparticle bead ซึ่งมีสีย้อมเรืองแสงในเม็ด bead เป็นพื้นฐานของการตรวจวิเคราะห์ ภายใน microparticle bead มีสีย้อมเรืองแสง 2 สี ปนกันอยู่ในสัดส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละ bead ทำให้สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของแต่ละ bead ได้ โดยในหลุมการทดสอบ 1 หลุมสามารถมีเม็ด bead ที่แตกต่างกันปะปนกันได้เป็นจำนวนมาก การตรวจวิธีนี้จึงเหมาะกับการวิเคราะห์ทางด้าน HLA ซึ่งมีความหลากหลายของแอนติเจนเป็นอย่างมาก เครื่อง Luminex fluoroanalyzer สามารถส่งสัญญาณเลเซอร์ได้ 2 สี โดยเลเซอร์ที่หนึ่งจะใช้ในการกระตุ้นสีย้อมเรืองแสงที่อยู่ภายใน bead เพื่อใช้ระบุหมายเลข bead และเลเซอร์ที่สองใช้ในการวิเคราะห์การจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน HLA บน bead ในการตรวจวิเคราะห์จะนำซีรัมของผู้ป่วยไปทดสอบกับ microparticle bead ซึ่งมีแอนติเจน HLA บริสุทธิ์เคลือบอยู่บนผิวของ bead หากในซีรัมผู้ป่วยมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HLA บน bead เมื่อใส่ anti-human immunoglobulin G (IgG) ซึ่งเชื่อมต่อกับสีย้อมเรืองแสง anti-human IgG จะจับกับแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ซึ่งจับอยู่กับแอนติเจนเป้าหมายบน bead และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ในเครื่อง Luminex จะสามารถตรวจได้ผลบวกหรือระบุความจำเพาะของแอนติบอดีได้ (ขึ้นอยู่กับชนิดของ microparticle bead) จากการตรวจวัดระดับความเข้มของสีย้อมเรืองแสง (mean fluorescence intensity, MFI)

Microparticle bead ที่ใช้ทดสอบแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะของแอนติเจน HLA ที่เคลือบอยู่บนผิว bead ได้แก่ pooled antigen bead, phenotypic bead และ single antigen bead

Pooled antigen bead หรืออาจเรียกง่ายๆ ว่า screening bead คือ bead ที่มีแอนติเจน HLA class I หรือ class II อยู่อย่างหลากหลายบน bead โดยแอนติเจน HLA ที่นำมาเคลือบบน bead นี้ได้มาจาก cell line (โดยส่วนใหญ่คือ Epstein-Barr virus (EBV) transformed B-cell line) จำนวนหลายๆ cell line การทดสอบกับ pooled antigen bead จะให้ผลเป็นบวกหรือลบ และใช้ในการตรวจคัดกรองหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA

Phenotypic bead หรืออาจเรียกว่า PRA bead เป็น bead ที่มี HLA phenotype (class I หรือ class II) ที่ได้มาจาก cell line เพียงหนึ่ง cell line ซึ่งมีแอนติเจน HLA จากคนเพียงหนึ่งคน นำมาเคลือบบนผิว bead phenotypic bead นี้ใช้ในการตรวจหาค่า panel reactive antibody (PRA) โดยคำนวณจากร้อยละของ bead ที่ให้ผลบวก ผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตที่มีผลบวกจาก screening bead ต้องได้รับการตรวจโดย phenotypic bead เพื่อนำค่า PRA ไปใช้ในการคำนวณคะแนนเพื่อจัดลำดับในการจัดสรรไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีผู้บริจาคไตที่มีชีวิต ควรได้รับการตรวจหาค่า PRA ก่อนปลูกถ่ายไตเช่นกัน เพื่อเป็นการประเมินความเสี่ยงทางภูมิคุ้มกันก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต

Single antigen bead (SAB) เป็น bead ซึ่งถูกเคลือบด้วยแอนติเจน HLA เพียงแอนติเจนเดียว SAB assay มีความไวและความจำเพาะสูง จึงใช้ในการบ่งบอกความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย ผลความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ที่ตรวจได้จากการทดสอบ Luminex assay จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับแอนติเจน HLA ของผู้บริจาคเพื่อบ่งว่าผู้ป่วยมีหรือไม่มี DSA ต่อผู้บริจาค

ข้อพึงรู้ทางเทคนิค

1. ความหลากหลายของปริมาณแอนติเจนบน bead

บน bead ทั้ง 3 ประเภทคือ pooled antigen bead, phenotypic bead และ SAB มีความแตกต่างในแง่ความหนาแน่นของแอนติเจนชนิดเดียวกัน แม้ bead ทั้ง 3 ประเภท มีแอนติเจน HLA ชนิดเดียวกันแต่ความหนาแน่นของแอนติเจนนั้นบน bead แต่ละประเภทมีปริมาณความหนาแน่นที่ไม่เท่ากัน⁶ นอกจากนี้บางแอนติเจนหรืออัลลีล HLA ซึ่งมีอยู่บน pooled antigen bead หรือ phenotypic bead อาจไม่ปรากฏอยู่บน SAB และในทางกลับกันแอนติเจนหรืออัลลีล HLA ซึ่งมีอยู่บน SAB ก็อาจไม่ปรากฏอยู่บน pooled antigen bead หรือ phenotypic bead⁷ ซึ่งการที่มีแอนติเจนหรืออัลลีล ปรากฏอย่างไม่สม่ำเสมอใน bead แต่ละประเภทนี้อาจส่งผลให้ผลการทดสอบที่ได้จาก bead แต่ละประเภทไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันได้

นอกจากความแตกต่างของ bead แต่ละประเภทแล้ว เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะใน SAB assay อย่างเดียว ก็พบว่ามีความหลากหลายเช่นกัน ความหนาแน่นของแอนติเจน HLA บนแต่ละ bead ใน SAB assay ของบริษัทเดียวกัน ก็มีความหนาแน่นไม่เท่ากัน⁸ และ ใน SAB assay ของบริษัทผู้ผลิตน้ำยาต่างบริษัทกัน ก็มีความหนาแน่นไม่เท่ากัน⁹ การที่มีความหนาแน่นของแอนติเจน

แตกต่างกันนี้จะส่งผลต่อการแปลค่า mean fluorescence intensity (MFI) หากในซีรัมผู้ป่วยมีแอนติบอดีปริมาณมาก แต่บน bead มีความหนาแน่นของแอนติเจนเป้าหมายน้อย เมื่อแอนติบอดีจับบน bead จะเกิดภาวะ saturation ของแอนติเจน และได้ค่า MFI ที่ต่ำกว่าความเป็นจริง เพราะยังมีแอนติบอดีที่ไม่ได้มีแอนติเจนให้จับเหลืออยู่

2. ความหลากหลายของคุณภาพแอนติเจนบน bead

ในขั้นตอนการผลิตน้ำยาของการทำให้แอนติเจน HLA จับอยู่บน microparticle bead นั้น มีผลให้รูปร่างตามธรรมชาติของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป¹⁰⁻¹¹ และทำให้เกิดการเปิดเผย epitope ของแอนติเจน HLA ซึ่งโดยปกติจะไม่ถูกตรวจพบในรูปร่างตามธรรมชาติ ส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมเมื่อทำการทดสอบได้¹² Gombos และคณะได้ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA โดย 3 วิธีคือ complement-dependent cytotoxicity (CDC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ SAB assay ในซีรัมของผู้ป่วยเข้าคิวรอปลูกถ่ายไต¹³ พบว่าในผู้ป่วย 133 รายที่ไม่มีประวัติการได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน HLA ของบุคคลอื่นมาก่อน (allo-HLA sensitization) มีผู้ป่วยจำนวน 102 ราย (คิดเป็นร้อยละ 77) ที่ให้ผลบวกกับ SAB assay ในขณะที่ร้อยละ 98 ของผู้ป่วยให้ผลลบโดยวิธี ELISA และ CDC คณะผู้ศึกษาสรุปว่า แอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ที่ตรวจพบโดยวิธี SAB assay ในผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติ sensitization มาก่อนน่าจะเป็นผลบวกปลอมซึ่งเกิดจากโมเลกุล HLA ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างตามธรรมชาติไป (denatured molecule) บน single antigen bead

3. สารรบกวน (interference)

IgM antibody หรือ serum factor อื่นๆ สามารถรบกวนการจับของ secondary antibody (fluorescence-conjugated anti-human IgG) ส่งผลให้เกิดผลลบปลอม (false-negative)⁸ ซึ่งต้องปฏิบัติการสามารถแก้ปัญหาเพื่อลดการรบกวนของ IgM antibody ได้โดยการเจือจางซีรัม (serum dilution) หรือ เติมน้ำ EDTA/dithiothreitol (DTT) หรือการใช้ความร้อน¹⁴⁻¹⁵

นอกจาก IgM antibody หรือสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในซีรัม สารจากภายนอกที่ผู้ป่วยได้รับเข้าไปสามารถรบกวนและส่งผลต่อการทดสอบได้เช่นกัน เช่น intravenous immunoglobulin (IVIG)¹⁶, antithymocyte globulin¹⁷ และ proteasome inhibitor (bortezomib)¹⁶ มีรายงานการศึกษาพบว่าซีรัมของผู้ป่วยที่ได้รับ IVIG มีค่า MFI ของ negative control bead สูงขึ้นมากกว่า 5 เท่าเมื่อเทียบกับค่า MFI ก่อนได้รับยา¹⁶ ส่วนยา antithymocyte globulin พบว่าส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมต่อแอนติเจน HLA

บางแอนติเจนได้¹⁷

4. มีการใช้ epitope เป้าหมายร่วมกันในหลาย bead

บางครั้งผู้ป่วยอาจมีแอนติบอดีต่อ common หรือ public epitope ซึ่งเมื่อทำการทดสอบ แอนติบอดีจะจับกับ common หรือ public epitope จึงทำให้แอนติบอดีมีการจับกระจายอยู่บนหลาย bead ส่งผลให้ค่า MFI ของ bead ที่มีการจับระหว่างแอนติบอดีต่อแอนติเจนเป้าหมายมีค่าต่ำลง¹⁸

5. ความซับซ้อนของโครงสร้างโมเลกุล HLA-DQ

แอนติเจน HLA-DQ เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็น heterodimer ประกอบขึ้นมาจากโปรตีน 2 เส้นคือสาย α และสาย β ซึ่งถูกถอดรหัสทางพันธุกรรมมาจากยีน HLA-DQA1 และยีน HLA-DQB1 ตามลำดับ แอนติเจน HLA-DQ มีลักษณะแตกต่างจากแอนติเจน HLA-DR ในแง่ที่ทั้งสาย α และ β ของแอนติเจน HLA-DQ นั้นมีความหลากหลายของอัลลีล (polymorphic) โดยสาย α มีความหลากหลายของอัลลีลน้อยกว่าสาย β ในขณะที่ความหลากหลายของแอนติเจน HLA-DR ขึ้นกับความหลากหลายของอัลลีลในสาย β เป็นหลัก โดยที่สาย α ของแอนติเจน HLA-DR แทบไม่มีความหลากหลายของอัลลีลเลย¹⁹

การบ่งชี้ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HLA-DQ โดยส่วนใหญ่ห้องปฏิบัติการจะบ่งชี้ความจำเพาะโดยพิจารณาสาย β เป็นหลัก แต่จากการศึกษาโดย Tamber AR และคณะ²⁰ ในผู้ป่วยที่รอปลูกถ่ายไตที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA-DQ 74 ราย พบว่าร้อยละ 13 ของผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อ epitope ที่อยู่เฉพาะบนสาย DQ α และร้อยละ 33 ของผู้ป่วยมีแอนติบอดีจำเพาะต่อ epitope ที่มาจากการดimerize ของทั้งสาย α และ β ซึ่งหมายความว่า epitope ที่แอนติบอดีจับนั้นเกิดจากการรวมตัวของสาย $\alpha\beta$ ดังนั้นการบ่งชี้ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HLA-DQ โดยพิจารณาเฉพาะสาย β โดยไม่คำนึงถึงสาย α เลยนั้นอาจทำให้การบ่งชี้ความจำเพาะของแอนติบอดีผิดพลาดได้

การกำหนด unacceptable antigen ในผู้ป่วยก่อนปลูกถ่ายไต

ปัจจุบันมีการศึกษาหลายรายงานยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างการที่ผู้ป่วยมี DSA ก่อนปลูกถ่ายไต มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของการเกิด antibody-mediated rejection หลังปลูกถ่ายไต และอัตราการอยู่รอดของไตที่ได้รับปลูกถ่ายลดลง¹⁻⁴ ดังนั้นผู้ป่วยทุกรายที่รอรับไตบริจาคจากผู้บริจาคสมองตายจึงควรได้รับการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการประเมินความเสี่ยงก่อนการผ่าตัด การที่ผู้ป่วยมี DSA และผลการตรวจความเข้ากันได้ (lymphocyte crossmatch) เป็นบวกถือเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไต แต่เนื่องจากการตรวจความ

เข้ากันได้ใช้เวลาทดสอบนานส่งผลให้เวลา cold ischemic time ยาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีผู้ป่วยหลายคนที่ทำให้ผลการตรวจความเข้ากันได้เป็นบวกจะยิ่งทำให้ใช้เวลานานในการจัดสรรไต ปัจจุบันสถาบันหรือโรงพยาบาลที่ทำการปลูกถ่ายอวัยวะหลายแห่งทั่วโลกจึงได้มีการพิจารณากำหนด unacceptable HLA antigen หรือ การทำ virtual crossmatch ในผู้ป่วยเข้าคิวรอรับไตจากผู้บริจาคสมองตาย เพื่อลดโอกาสการเกิดการตรวจความเข้ากันได้เป็นบวกและส่งผลให้สามารถลดระยะเวลาของ cold ischemic time ได้

การทำ virtual crossmatch คือ การทำนายผลของการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคไตล่วงหน้า ก่อนทำการทดสอบความเข้ากันได้จริงๆ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการทำนายนี้ใช้ฐานข้อมูลของผลการทดสอบแอนติบอดีต่อ HLA ในผู้ป่วยและผล HLA typing ในผู้บริจาค หากผู้ป่วยมีความจำเพาะของแอนติบอดีตรงกับแอนติเจน HLA ใด แอนติเจน HLA นั้นจะถูกบ่งว่าเป็น “unacceptable antigen” คือแอนติเจนที่ผู้ป่วยไม่สามารถรับได้ ข้อมูลนี้จะถูกบันทึกลงในคอมพิวเตอร์และเมื่อมีผู้บริจาคไตสมองตาย หากผู้บริจคนั้นมีแอนติเจนตรงกับ unacceptable antigen ของผู้ป่วย ซึ่งรวมผู้ป่วยจะไม่ถูกนำมาทดสอบความเข้ากันได้ ซึ่งหมายถึงว่าผู้ป่วยจะไม่มีโอกาสได้รับไตบริจาคที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยนั่นเอง

การตัดสินใจว่าแอนติเจนใดเป็น unacceptable antigen นั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากหากผู้ป่วยมี unacceptable antigen เป็นจำนวนมาก โอกาสที่ผู้ป่วยจะอยู่ในรายชื่อของผู้ที่มีโอกาสรับไตบริจาคในแต่ละครั้งก็จะลดลง ในทางตรงกันข้าม หากการกำหนด unacceptable antigen ทำได้ไม่ถูกต้อง คือบ่งชี้จำนวนได้น้อยกว่าความเป็นจริง อาจส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของไตปลูกถ่ายลดลงได้

ความแตกต่างของค่า cut off ในการนิยาม unacceptable antigen ในประเทศต่างๆ

ปัญหาที่ยังคงเป็นข้อถกเถียงคือ การพิจารณากำหนดค่า cut off ในการนิยาม unacceptable antigen ในผู้ป่วยที่เข้าคิวรอรับไตบริจาค เนื่องจากการศึกษาในผู้ป่วยที่มี DSA จากการทดสอบโดย solid phase immunoassay (SPI) เพียงอย่างเดียวแต่ผลการตรวจความเข้ากันได้เป็นลบ พบว่าอัตราการเกิด antibody-mediated rejection (AMR) ภายหลังปลูกถ่ายไตมีความหลากหลายตั้งแต่ร้อยละ 20 ถึง ร้อยละ 55^{1,21-23} แต่ก็มีการศึกษาที่รายงานว่า การตรวจพบ DSA ด้วยวิธี SPI เพียงอย่างเดียวนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด AMR ที่เพิ่มขึ้น²⁴⁻²⁶

นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MFI และผลการปลูกถ่ายไตก็ยังเป็นที่ถกเถียงเช่นกัน ได้มีการศึกษารายงานว่า ลักษณะต่างๆ ของ DSA เช่น class จำนวน หรือ ค่า MFI ไม่มีความสัมพันธ์ในการทำนายผลการปลูกถ่ายไต^{21,23} ในขณะที่มีรายงานการศึกษาพบว่า ความแรงของ DSA มีความสัมพันธ์กับการเกิด AMR อัตราการอยู่รอดของไตปลูกถ่าย และผลสำเร็จของการทำ desensitization²⁷

ปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดค่า cut off ในการนิยาม unacceptable antigen ที่เป็นมาตรฐานในระดับนานาชาติ ในสหรัฐอเมริกา นั้นสถาบันปลูกถ่ายไตแต่ละสถาบันจะกำหนดค่า cut off สำหรับการนิยาม unacceptable antigen ของผู้ป่วยของแต่ละสถาบันเอง และข้อมูล unacceptable antigen จะถูกส่งเข้าไปในฐานข้อมูลของ The United Network for Organ Sharing (UNOS) การกำหนดค่า cut off สำหรับนิยาม unacceptable antigen ของประเทศแถบยุโรปที่เข้าร่วมใน Eurotransplant ก็ขึ้นกับการพิจารณาของแต่ละประเทศเองเช่นกัน จาก Table 1 ซึ่งแสดงค่า cut off ในการนิยาม unacceptable antigen ในแต่ละประเทศแสดงให้เห็นว่า ค่า cut off ที่ใช้นั้นมีความหลากหลายเป็นอย่างมาก²⁸⁻³¹

การพิจารณากำหนด unacceptable antigen ในประเทศไทย

เกณฑ์การจัดสรรไตของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย ในปัจจุบัน กำหนดไว้ว่าหากผู้ป่วยมีแอนติบอดีตรงกับแอนติเจน HLA ของผู้บริจาค จะไม่ได้รับการตรวจความเข้ากันได้ ซึ่งหมายถึงว่าสถาบันหรือโรงพยาบาลซึ่งเป็นศูนย์ปลูกถ่ายไตต้องมีการกำหนด unacceptable antigen ไว้ในฐานข้อมูลของผู้รอรับไตบริจาค เนื่องจากการใช้จ่ายในการตรวจ SAB มีราคาแพงมาก ผู้ป่วยเข้าคิวรอรับไตบริจาคส่วนใหญ่มีปัญหาในการจ่ายค่าตรวจ SAB เพื่อป้องกันความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ดังนั้น ข้อมูล unacceptable antigen ของผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงได้จากการพิจารณาผลตรวจวิเคราะห์ด้วยน้ำยา PRA bead (phenotypic bead) โดย Luminex assay ในปี พ.ศ. 2557 ห้องปฏิบัติการที่รับตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ทั่วประเทศได้ประชุมร่วมกับศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย เพื่อพิจารณาเกณฑ์การกำหนด unacceptable antigen ในผู้ป่วยเข้าคิวรอรับไตบริจาค ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วประเทศ และได้ข้อสรุปว่าทุกสถาบันควรต้องระบุ unacceptable antigen เมื่อแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA-A, HLA-B และ HLA-DR จากการตรวจด้วยน้ำยา PRA bead นั้นมีค่า mean raw MFI > 2,000

Table 1 Different cut off levels for the determination of unacceptable HLA antigen in kidney transplantation

Center	Allocation organization	Number of patient in waiting list	XM method	Cut off for assignment of unacceptable antigen by SAB	Ref
Montefiore-Einstein Center for Transplantation, USA	UNOS	1,069	FCXM	anti-HLA-A, -B, -DR with MFI > 5,000 anti-HLA-DQ with MFI > 10,000	Marfo et al ²⁸
Texas Transplant Institute, USA	UNOS	Not specified	FCXM	anti-HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP with MFI > 2,000	Bingaman et al ²⁹
Regional Transplant Center of Lazio Region, Italy	Italian National Transplant Centre	Not specified	CDC and FCXM	anti-HLA-A, -B, -C, -DR, DQ with MFI > 5,000	Piazza et al ³⁰
Sao Paulo, Brazil	Brazilian Transplant System	4,400	CDC-AHG	anti-HLA-A, -B, -DR with MFI > 1,500	Susal et al ³¹
Berlin, Germany	Eurotransplant	1,600	CDC	anti-HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP with MFI > 1,000	Susal et al ³¹
Barcelona, Spain	Catalan Transplant Organization	1,000	CDC	Anti-HLA-A, -B, -DR with MFI > 3,000	Susal et al ³¹

CDC, complement-dependent cytotoxicity; CDC-AHG, anti-human globulin augmented complement-dependent cytotoxicity with FCXM, flow cytometry crossmatch; HLA, human leukocyte antigen; MFI, mean fluorescence intensity; Ref, reference; SAB, single antigen bead; UNOS, United Network for Organ Sharing; USA, United States of America; XM, crossmatch

สรุป

การตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA ก่อนปลูกถ่ายไตนั้นเป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อใช้ในการประเมินความเสี่ยงทางภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยก่อนได้รับการปลูกถ่ายไต ปัจจุบันการใช้เทคนิค solid phase immunoassay (SPI) ในการตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจน HLA นั้นทำให้การตรวจมีความไวเป็นอย่างมาก แต่เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อจำกัดบางอย่างซึ่งผู้ใช้ผลการตรวจควรมีความเข้าใจเพื่อนำผลการตรวจไปใช้ทางคลินิกได้อย่างถูกต้อง หลังจากได้มีการนำเทคนิค SPI มาใช้ หลายประเทศได้นำข้อมูลผลการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี SPI มาใช้ในการระบุ unacceptable antigen ในผู้ป่วยที่เข้าคิวรอรับไตบริจาค ซึ่งเกณฑ์ในการนิยาม unacceptable antigen ก็มีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศทั่วโลก ในประเทศไทยเองเกณฑ์การพิจารณา unacceptable antigen เพิ่งเริ่มใช้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วประเทศได้ไม่นานนัก ผลกระทบต่อผู้ป่วยกลุ่ม highly HLA-sensitized จะเป็นอย่างไร ควรต้องมีการติดตามต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1231-8.
- Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-500.
- Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* 2012;12:1618-23.
- Singh N, Djamali A, Lorentzen D, Pirsch JD, Levenson G, Neidlinger N, et al. Pretransplant donor-specific antibodies detected by single-antigen bead flow cytometry are associated with inferior kidney transplant outcomes. *Transplantation* 2010;90:1079-84.
- Lobashevsky AL. Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World J Transplant* 2014;4:153-67.
- Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95:19-47.
- Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant* 2014;14:1964-75.
- Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, Chaudhry AN, Taylor CJ. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009;87:813-20.
- Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody testing in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1489-502.
- Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schonemann C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009;88:226-30.
- Pereira S, Perkins S, Lee JH, Shumway W, LeFor W, Lopez-Cepero M, et al. Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol* 2011;72:492-8.
- Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008;86:1111-5.
- Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant* 2013;13:2075-82.
- Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads-a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011;92:510-5.
- Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol* 2009;70:496-501.
- Badders JL, Houpi JA, Sholander JT, Leffell MS, Zachary AA. Considerations in interpreting solid phase antibody data. *Hum Immunol* 2010;71:S18.
- Masson E, Devillard N, Chabod J, Yannaraki M, Thevenin C, Tiberghien P, et al. Misleading de novo detection of serum anti-HLA-A3 antibodies in kidney recipients having received ATG before transplantation. *Hum Immunol* 2010;71:170-5.
- Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology-challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010;76:87-95.
- Al Attas R, Al Abduladheem D, Shawhatti AA, Lopez R, Liacini A, AlZahrani S, et al. The dilemma of DQ HLA-antibodies. *Hum Immunol* 2015;76:324-8.
- Tambur AR, Leventhal JR, Friedewald JJ, Ramon DS. The complexity of human leukocyte antigen (HLA)-DQ antibodies and its effect on virtual crossmatching. *Transplantation* 2010;90:1117-24.
- Amico P, Honger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009;87:1681-8.

22. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:2132-43.
23. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1398-406.
24. Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, Pascual M. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum Immunol* 2009;70:580-3.
25. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011;91:527-35.
26. Phelan D, Mohanakumar T, Ramachandran S, Jendrisak MD. Living donor renal transplantation in the presence of donor-specific human leukocyte antigen antibody detected by solid-phase assay. *Hum Immunol* 2009;70:584-8.
27. Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:922-36.
28. Marfo K, Ajaimy M, Colovai A, Kayler L, Greenstein S, Lubetzky M, et al. Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation* 2014;98:1082-8.
29. Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation* 2008;86:1864-8.
30. Piazza A, Ozzella G, Poggi E, Caputo D, Manfreda A, Adorno D. Virtual crossmatch in kidney transplantation. *Transplant Proc* 2014;46:2195-8.
31. Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens* 2013;82:83-92.