

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาการตรวจหาจีโนไทป์ Human Platelet Antigen-21 (HPA-21w) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) ในผู้บริจาคโลหิต ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

มยุรี เก่งเกต¹ ศรีประไพ ขนุนทอง² ภาวินี คุปตวินทุ² อรรถพล ศรีสุดดี² ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ²
และ ชาย ฤกษ์ชัย²

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ²ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ HPA-21w เป็นแอนติเจนของเกล็ดเลือดหนึ่งที่มีความสำคัญทางคลินิกโดยเฉพาะในคนเอเชียซึ่งยังไม่มีรายงานความถี่ของแอนติเจนนี้ในคนไทย **วัตถุประสงค์** การศึกษานี้ได้ทำการตรวจจีโนไทป์ของยีน HPA-21 ในผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความสำคัญทางคลินิกในประเทศไทย **วิธีการศึกษา** ได้ดำเนินการศึกษาจีโนไทป์ HPA-21w โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเกล็ดเลือดจำนวน 314 ราย และตัวอย่างควบคุมที่ทราบชนิด HPA-21w และคำนวณความถี่ของแอนติเจนที่พบในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต **ผลการศึกษา** จากการศึกษาความถี่ของแอนติเจน HPA-21w ในกลุ่มผู้บริจาคเกล็ดเลือด 314 ราย ด้วยวิธี PCR-SSP พบ HPA-21a21a จำนวน 313 ราย (99.68%) HPA-21a21b จำนวน 1 ราย (0.32%) และไม่พบ HPA-21b21b ความถี่ของอัลลีล HPA-21a เท่ากับ 0.998 และ HPA-21b เท่ากับ 0.002 สำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบ HPA-21a21b ได้ทำการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค DNA sequencing **สรุป** จากการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจจีโนไทป์ของ HPA-21w ในผู้บริจาคโลหิตคนไทย ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็น HPA-21a21a และพบ HPA-21a21b เพียง 1 รายเท่านั้น ส่วน HPA-21b21b ไม่พบในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามควรศึกษาในจำนวนตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทำนายความเสี่ยงการเกิด alloimmunization ต่อ HPA-21 ต่อไป

Keywords : ● Human platelet antigens ● HPA-21w ● PCR-SSP ● Thai blood donors

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:107-14.

บทนำ

แอนติเจนของเกล็ดเลือด หรือ Human platelet antigen (HPA) ปัจจุบันมีรายงาน 35 ชนิดได้แก่ HPA-1 ถึง HPA-29bw สำหรับแอนติเจนของ HPA1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 และ HPA-15 เป็น biallelic คือแต่ละระบบประกอบด้วยแอนติเจน 2 ชนิดคือ a และ b โดยแอนติเจนที่พบได้มากกว่ากำหนดเป็นชนิด a และแอนติเจนที่พบน้อยกว่ากำหนดเป็นชนิด b ความแตกต่างของแอนติเจน HPA ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโปรตีนโดยเกิดจากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง (single nucleotide polymorphism; SNP) ดังแสดงใน Table 1¹⁻² แอนติเจน HPA ที่มีความสำคัญทางคลินิกคือ HPA-1 ถึง HPA-5 และ HPA-15 แอนติเจนของเกล็ดเลือด

แตกต่างกันทำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี เมื่อมีการกระตุ้นจากการตั้งครรภ์หรือได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือด ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกเช่น ภาวะ fetal-neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) ซึ่งมีสาเหตุจากเกล็ดเลือดของทารกแรกคลอดถูกทำลายโดยแอนติบอดีจากมารดา แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดภาวะนี้ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีต่อ HPA-1a³⁻⁴ ภาวะ platelet transfusion refractoriness (PTR) ซึ่งหมายถึงภาวะที่ผู้ป่วยเกล็ดเลือดต่ำที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยการให้เกล็ดเลือด เมื่อให้เกล็ดเลือดเข้มข้นแล้วปริมาณเกล็ดเลือดของผู้ป่วยไม่เพิ่มขึ้นตามต้องการ⁵⁻⁷ และภาวะ post-transfusion purpura (PTP) ซึ่งมีสาเหตุจากได้รับโลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิต ที่มีแอนติเจนบนผิวของเกล็ดเลือดไม่ตรงกันทำให้ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไปทำให้เกิดอาการเลือดออกอย่างรุนแรงได้⁸⁻¹⁰ ดังนั้นผู้ป่วยที่มีภาวะต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องได้รับเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนที่ตรงกันระหว่างผู้บริจาคและผู้ป่วย

ได้รับต้นฉบับ 3 มีนาคม 2559 รับลงตีพิมพ์ 16 พฤษภาคม 2559

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ดร.มยุรี เก่งเกต คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ถนนบางนา-ตราด กม.18 ต.บางโหลง

อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540 E-mail: mayuree.ke@gmail.com

Table 1 Polymorphism resulting in amino acid substitution in human platelet antigens (HPAs)

Antigen	Nucleotide change	Amino acid change	Glycoprotein /HGNC*	Ref_Seq
HPA-1	176T>C	Leu33Pro	GPIIIa / <i>ITGB3</i>	NM_000212
HPA-4	506G>A	Arg143Gln		
HPA-6w	1544G>A	Arg489Gln		
HPA-7w	1297C>G	Pro407Ala		
HPA-8w	1984C>T	Arg636Cys		
HPA-10w	263G>A	Arg62Gln		
HPA-11w	1976G>A	Arg633His		
HPA-14w	1909-1911delAAG	Lysine611 deletion		
HPA-16w	497C>T	Thr140Ile		
HPA-17w	662C>T	Thr195Met		
HPA-19w	487A>C	Lys137Gln		
HPA-21w	1960G>A	Glu628Lys		
HPA-23bw	1942C>T	Arg622Trp		
HPA-26bw	1818G>T	Lys580Asn		
HPA-29bw	98C>T	Thr7Met		
HPA-2	482C>T	Thr145Met	GPIIb / <i>GP1BA</i>	NM_000173
HPA-3	2621T>C	Ile843Ser	GPIIb / <i>ITGA2B</i>	NM_000419
HPA-9W	2602G>A	Val837Met		
HPA-20w	1949C>T	Thr619Met		
HPA-22bw	584A>C	Lys164Thr		
HPA-24bw	1508G>A	Ser472Asn		
HPA-27bw	2614C>A	Leu841Met		
HPA-28bw	2311G>T	Val740Leu		
HPA-5	1600G>A	Glu505Lys	GPIa / <i>ITGA2</i>	NM_002203
HPA-13w	2483C>T	Thr799Met		
HPA-18w	2235G>T	Gln716His		
HPA-25bw	3347C>T	Thr1087Met		
HPA-12W	119G>A	Gly15Glu	GPIIb / <i>GP1BB</i>	NM_000409
HPA-15	2108C>A	Ser682Tyr	CD109 / <i>CD109</i>	NM_133493

* HGNC : name of encoding gene by the Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee

การตรวจหาชนิดแอนติเจนบนเกล็ดเลือดทำได้หลายวิธีเช่น วิธีทางอิมมูโนโลยีโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะมาทำปฏิกิริยากับ แอนติเจนบนเกล็ดเลือด เช่น solid-phase red cell adherence assay (SPRCA), monoclonal antibody immobilization of platelet antigen (MAIPA) ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการเช่น ไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนบางชนิด เกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่ใช้ทดสอบมีปริมาณน้อย และการอ่านผลที่ไม่ชัดเจน ดังนั้น ปัจจุบันจึงนิยมตรวจด้วยวิธีระดับโมเลกุล โดยตรวจจีโนมไทป์ของ HPA จากตัวอย่างดีเอ็นเอ เช่น polymerase chain reaction with fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR

with allele specific oligonucleotides hybridization (PCR-ASO), PCR with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), PCR with sequence specific primers (PCR-SSP), real-time PCR และ DNA sequencing¹¹⁻¹³

ความถี่อัลลีลของยีน HPA แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร เช่น HPA-1b พบมากในประชากรผิวขาว (Caucasian) HPA-4b พบมากในคนไทย ส่วนคนไทยพบว่ามีค่าของอัลลีลใกล้เคียงกับประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และจีน ดังแสดงใน Table 2¹⁴⁻²⁴ นอกจากนี้ยังมีรายงานความถี่ของ HPA-21b ซึ่งพบได้ความถี่สูงในคนจีน^{15,25} และที่มีรายงานภาวะ FNAIT ที่มี

Table 2 The HPA gene frequencies in different populations

System	Chinese ^{14,15}		Japanese ¹⁶		Korean ¹⁷		Indonesian ¹⁸		Malaysian ¹⁹		Thai ²⁰		African ²¹		German ²²		British ²³		Australian ²⁴	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
HPA-1	0.9913	0.0087	0.9980	0.0020	0.9880	0.0020	0.9910	0.0090	0.9750	0.0250	0.9850	0.0150	1.0000	0.0000	0.8400	0.1600	0.8400	0.1600	0.8520	0.1480
HPA-2	0.9480	0.0520	0.9000	0.1000	0.9230	0.0770	0.9390	0.0600	0.9625	0.0375	0.9520	0.0480	0.6070	0.3930	0.9300	0.0700	0.9250	0.0750	0.9180	0.0820
HPA-3	0.5580	0.4420	0.7180	0.2820	0.5550	0.4450	0.5050	0.4950	0.5025	0.4975	0.5600	0.4400	0.5000	0.5000	0.6000	0.4000	0.6270	0.3730	0.6120	0.3880
HPA-4	0.9980	0.0020	0.9890	0.0110	0.9900	0.0100	1.0000	0.0000	0.9950	0.0050	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	NT	NT	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
HPA-5	0.9880	0.0120	0.9730	0.0270	0.9780	0.0220	0.9950	0.0050	0.9500	0.0500	0.9680	0.0320	0.5950	0.4050	0.9200	0.0800	0.9140	0.0860	0.8920	0.1080
HPA-6	0.9867	0.0133	0.9730	0.0270	0.9800	0.0200	0.9670	0.0330	0.9925	0.0075	0.9860	0.0140	1.0000	0.0000	NT	NT	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
HPA-7w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-8w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-9w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-10w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-11w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-12w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-13w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-14w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-15	0.5467	0.4533	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0.5150	0.4850	0.5090	0.4910	0.6980	0.3020	NT	NT	0.5240	0.4760	0.5000	0.5000
HPA-16w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-17w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-18w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-19w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-20w	1.0000	0.0000	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HPA-21w	0.9906	0.0094	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

สาเหตุจากแอนติบอดี HPA-21b²⁶ จากการศึกษาความถี่อัลลีล HPA ของคนไทยที่เคยมีรายงานไว้พบว่า ประชากรไทยมีความถี่อัลลีลของระบบ HPA-1 ถึง HPA-6 และ HPA-15 ใกล้เคียงกับคนจีน^{12-14,18,20,27-28} จึงคาดว่าน่าจะพบความถี่อัลลีล HPA-21b ในคนไทยใกล้เคียงกับคนจีน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษานำร่องเพื่อสำรวจจีโนไทป์ HPA-21w ในผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยใช้เทคนิค PCR-SSP

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้การศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาการตรวจ HPA-21w ประกอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเกล็ดเลือด ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติที่เหลื่อใช้ในงานประจำ จำนวน 314 ราย และตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม HPA-21a21a ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ทำการทดสอบแล้วจากวิธี DNA sequencing และ HPA-21b21b ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอสังเคราะห์ (gBlocks Gene Fragment) ความเข้มข้น 0.00018 mM (Integrated DNA Technologies, USA)

การตรวจ HPA-21w genotyping ด้วยวิธี PCR-SSP

ตรวจหาจีโนไทป์ของระบบ HPA-21w ในดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี PCR-SSP ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Liu Y และคณะ¹⁵ โดยใช้ไพรเมอร์ทดสอบสองชุด คือ ชุดที่จำเพาะกับอัลลีล HPA-21a คือ 5'-ACCGGGGAGCCCTACATGATG-3' (forward) และ 5'-GCCTGCACAAACATTCCTTGAGGT-3' (reverse)¹⁵ ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน human growth hormone (HGH) 1 คู่ คือ 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTTA-3' (forward) และ 5'-GTCCATGTCTTCTCTGAAGCA-3' (reverse)²⁸ และ

ไพรเมอร์ชุดที่จำเพาะกับอัลลีล HPA-21b คือ 5'-ACCGGGGAGCCCTACATGATA-3' (forward) และ 5'-GCCTGCACAAACATTCCTTGAGGT-3' (reverse)¹⁵ ร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน HGH

ส่วนผสมในแต่ละปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับจีโนไทป์ HPA-21a และ HPA-21b มีปริมาตรรวมทั้งหมด 10 μ L ซึ่งประกอบด้วย Gotaq[®]Green Master Mix (Promega, USA) 5 μ L, ไพรเมอร์ 2 μ L (HPA-21a หรือ HPA-21b (forward) ความเข้มข้น 2.4 mM 0.5 μ L, HPA-21a หรือ HPA-21b (reverse) ความเข้มข้น 2.4 mM 0.5 μ L, HGH (forward) และ HGH (reverse) ความเข้มข้น 6.4 mM อย่างละ 0.5 μ L), น้ำกลั่น (DW) 2 μ L และดีเอ็นเอ 1 μ L (ความเข้มข้น 50-150 ng) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (Boeco, Germany) โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ อ่านผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปแยกด้วยเครื่อง gel electrophoresis ที่ 150 โวลต์ นาน 8 นาที โดยใช้ 2% agarose gel ที่มี ethidium bromide 1 μ L ผสมอยู่ แล้วนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator การอ่านผลแต่ละ lane ปฏิกิริยาจะพบแถบของดีเอ็นเอควบคุม (internal control band) ซึ่งเป็นส่วนของยีน HGH ในตำแหน่ง 1,024 bp และพบแถบดีเอ็นเอที่เป็น HPA-21a และ HPA-21b ในตำแหน่ง 204 bp ดังแสดงใน Figure1

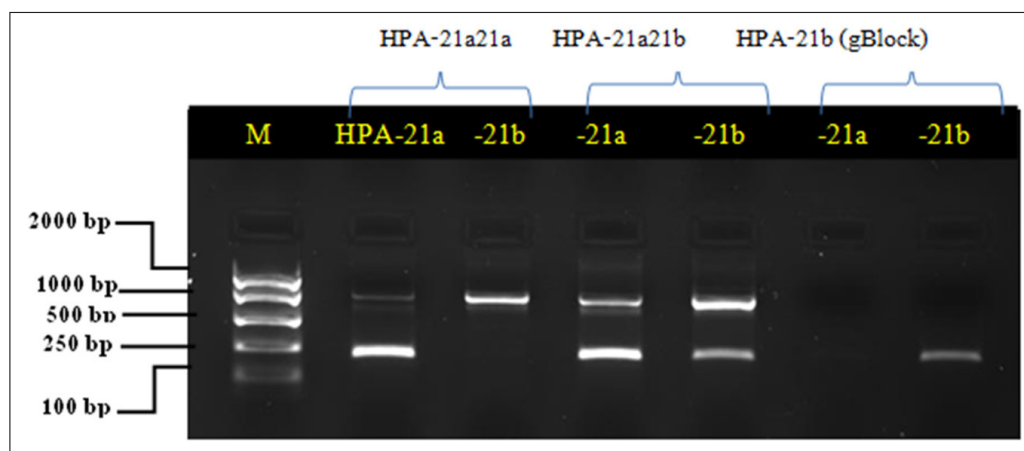


Figure 1 The HPA-21 genotyping results by PCR-SSP. From left to right, HPA-21a21a, HPA-21a21b and HPA-21b21b, the 1024 by amplification product of HGH control primers was observed in all lands, whereas the positive specific products for HPA-21a and HPA-21b were demonstrated at 204 bp, DNA marker (TrackIt[™]) (Invitrogen[™], USA)

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมชนิด HPA-21a21a และ HPA-21b21b ในการปรับสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งแต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยา PCR สองหลอด โดยในหลอดปฏิกิริยาที่ 1 มีไพรเมอร์สำหรับตรวจ HPA-21a และ HGH (control reaction) ส่วนในหลอดที่ 2 มีไพรเมอร์สำหรับตรวจ HPA-21b และ HGH ทุกหลอดปฏิกิริยาจะให้ผลบวกในตำแหน่ง HGH (1024 bp) หากตัวอย่างที่ให้ผลบวกในตำแหน่ง HPA-21 (204 bp) เฉพาะหลอดที่ 1 แปลผลได้เป็นจีโนไทป์ HPA-21a21a หากตัวอย่างที่ให้ผลบวก HPA-21 เฉพาะหลอดที่ 2 แปลผลได้เป็นจีโนไทป์ HPA-21b21b ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลบวก HPA-21 ทั้งสองหลอด แปลผลได้เป็นจีโนไทป์ HPA-21a21b ดังแสดงใน Figure 1

จากการตรวจจีโนไทป์ระบบ HPA-21w ในตัวอย่างดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติจำนวน 314 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคโลหิตได้ผลจีโนไทป์เป็น HPA-21a21a จำนวน 313 ตัวอย่าง (99.68%) และ HPA-21a21b จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.32%) และตรวจไม่พบ HPA-21b21b นอกจากนี้ได้ตรวจ HPA-21w genotyping วิธี PCR-SSP นี้กับตัวอย่างควบคุม HPA-21a และ HPA-21b ให้ผลสอดคล้องกันทุกครั้งของการทดสอบ สำหรับตัวอย่างที่ตรวจเป็นจีโนไทป์ HPA-21a21b ได้ทำการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่าให้ผลตรงกันกับเทคนิค PCR-SSP ดังแสดงใน Figure 2

วิจารณ์

ปัจจุบันการสำรวจความถี่ของยีน HPA ได้มีการศึกษาในหลายเชื้อชาติ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาแอนติเจนที่มีความสำคัญทางคลินิก 7 ระบบได้แก่ HPA-1 ถึง HPA-6 และ HPA-15 ซึ่งพบ

ความถี่ของแอนติเจนทั้ง a และ b ได้บ่อย แต่ความถี่ของแอนติเจน HPA ดังกล่าว มีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ ก่อให้เกิดปัญหาการสร้างแอนติบอดีในผู้ป่วยที่แตกต่างกัน เช่น ในประชากรผิวขาวพบแอนติบอดีต่อ HPA-1a และ HPA-1b ได้บ่อยกว่าในประชากรชาวเอเชีย³⁻⁵ แอนติบอดีต่อ HPA-4 พบมีปัญหาคross-reactivity ได้บ่อยในญี่ปุ่น^{5,29} ปัจจุบันมีการศึกษาความถี่ของยีน HPA ในคนจีนเพิ่มขึ้น ทำให้พบแอนติเจนที่อาจมีความสำคัญทางคลินิกได้แก่ HPA-21w ซึ่งพบความถี่ของอัลลีลได้ทั้ง HPA-21a และ HPA-21b จากรายงานวิจัยของ Zhou H และคณะ²⁵ ที่ศึกษาแอนติเจนของ HPA-21w ในชาวจีน Cantonese พบว่า HPA-21a21a ร้อยละ 98.90 และ HPA-21a21b ร้อยละ 1.10 โดยความถี่อัลลีล HPA-21a เท่ากับ 0.9945 และความถี่อัลลีล HPA-21b เท่ากับ 0.00554 และจากรายงานวิจัยของ Liu Y. และคณะ¹⁵ ที่ศึกษาในชาวจีน Han พบ HPA-21a21a ร้อยละ 98.13 และ HPA-21a21b ร้อยละ 1.87 โดยความถี่อัลลีล HPA-21a เท่ากับ 0.9906 และความถี่อัลลีล HPA-21b เท่ากับ 0.00945 เคยมีรายงานว่า แอนติบอดีต่อ HPA-21 ก่อให้เกิดปัญหา FNAIT ได้²⁶ ความแตกต่างของแอนติเจน HPA-21a และ HPA-21b เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) จาก guanine (G) เป็น adenine (A) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก glutamic acid เป็น lysine (1960G>A, Glu628Lys)

จากการศึกษาจีโนไทป์ HPA-21w ในคนไทยครั้งนี้ พบว่าความถี่ของอัลลีล HPA-21a เท่ากับ 0.998 ความถี่ของอัลลีล HPA-21b เท่ากับ 0.002 ซึ่งพบได้น้อยกว่าคนจีน การใช้วิธี PCR-SSP มีข้อดีคือสามารถตรวจจีโนไทป์ HPA-21w ได้โดยไม่ต้องใช้แอนติซีรัมซึ่งยังไม่มีขายโดยบริษัทต่างประเทศ ทำให้ช่วยในการทำนายความเสี่ยงของปัญหาการเกิด alloimmunization ของ HPA-21w ในคนไทยได้ต่อไป

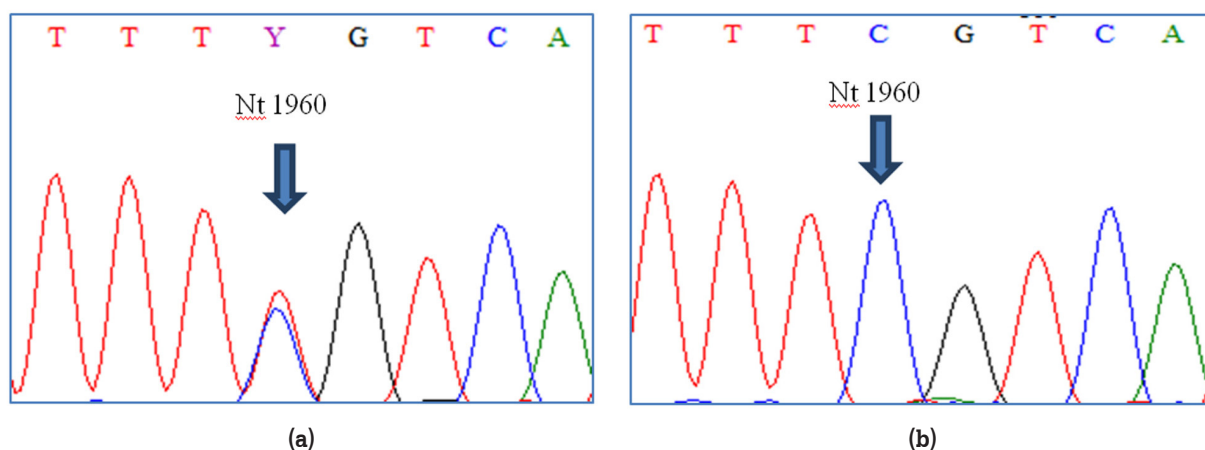


Figure 2 DNA sequencing chromatograms of SNP position in heterozygous HPA-21a21b (a) and homozygous HPA-21a21a (b). The arrows indicate the variant nucleotides at position 1,960 of the GPIIIa gene (C/T and C/C)

สรุป

จากการศึกษาที่ได้ตรวจจีโนไทป์ของ HPA-21w ในผู้ป่วยโรคโลหิตจกคนไทย ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็น HPA-21a21a และพบ HPA-21a21b เพียง 1 รายเท่านั้น ส่วน HPA-21b21b ไม่พบในการศึกษา นี้ อย่างไรก็ตามควรศึกษาในจำนวนตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทำนายความเสี่ยงการเกิด alloimmunization ต่อ HPA-21w ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) [Internet]. United Kingdom: The European Bioinformatics Institute [cited 2016 Jan 11] Available from: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>.
2. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Marsh SG. IPD-the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res* 2013;41:1234-40.
3. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics* 2014;133:715-21.
4. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1,162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2004;44:1220-5.
5. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang* 2014;106:93-102.
6. Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santos S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 2001;41:766-70.
7. Kupatawintu P, Nathalang O, Jitjak N, Sealee S, O-Charoen R. The incidence of platelet thrombocytopenic patients. *J Hematol Transfu Med* 2000;10:123-7.
8. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. *Transfus Apher Sci* 2003;28:297-305.
9. Kroll H, Kiefel V, and Mueller-Eckhardt C. Post-transfusion purpura: clinical and immunologic studies in 38 patients. *Infusionsther Transfusionsmed* 1993;20:198-204.
10. Ziman A, Klapper E, Pepkowitz S, Smith R, Garratty G, Goldfinger D. A second case of post-transfusion purpura caused by HPA-5a antibodies: successful treatment with intravenous immunoglobulin. *Vox Sang* 2002;83:165-6.
11. Veldhuisen B, Porcelijn L, Ellen van der Schoot C, de Haas M. Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). *Transfus Apher Sci* 2014;50:189-99.
12. Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, Liu Y, Hong X, et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sang* 2009;97:330-7.
13. Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Srisuddee A, Chantratita W, Nathalang O. Comparison of a Simple-Probe Real-Time PCR and Multiplex PCR Techniques for HPA-1 to HPA-6 and HPA-15 Genotyping. *J Clin Lab Anal* 2015;29:94-9.
14. Xu X, Liu Y, Ying Y, Tao S, Hong X, Zhu F, et al. Human platelet antigen allele frequencies and new mutations on platelet glycoprotein genes in the Chinese Han population. *Transfus Med* 2011;21:330-7.
15. Liu Y, Hong X, Xu X, Ying Y, He J, Zhu F, et al. Prevalence of the HPA-18w to -21w alleles in the Chinese Han population. *Int J Immunogenet* 2013;40:99-103.
16. Tanaka S, Taniue A, Nagao N, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, et al. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox Sang* 1995;68:225-30.
17. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998;8:129-32.
18. Liu TC, Shih MC, Lin CL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-8w platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, and Thai. *Ann Hematol* 2002;81:244-8.
19. Tan JY, Lian LH, Nadarajan VS. Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population. *Blood Transfus* 2012;10:368-76.
20. Kupatawintu P, Nathalang O, O-Charoen R, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. *Immunohematology* 2005;21:5-9.
21. Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, M'Bayo K, Jaeger G, Anani L, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 2005;65:295-8.
22. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 1997;28:1392-5.
23. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet* 2003;30:415-9.
24. Hohensteiner A, Walchshofer S, Adler A, Kittl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis* 1995;25:133-6.
25. Zhou H, Ding H, Chen Y, Li X, Nie Y. Simultaneous genotyping of HPA-17w to -21w by PCR-SSP in Chinese Cantonese. *Platelets* 2015;26:186-9.

26. Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, Curtis B, McFarland J, Bougie D, Aster R. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2010;50:324-33.
27. Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, et al. Establishment of an HPA-1 to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med* 2006;16:369-74.
28. Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Kanunthong S, Chantarit W, Nathalang O. Genotyping of HPA-1 to -7 and -15 in the Thai population using multiplex PCR. *Transfus Med* 2012;22:272-6.
29. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion*. 1996;36:813-7.

Preliminary study of HPA-21w Genotyping using Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer technique (PCR-SSP) in Thai Blood Donors of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Mayuree Kengkate¹, Sriprapai Khanuntong², Pawinee Kupatawintu², Atthaphol Srisuddee²,
Sirilak Phiancharoen² and Chai Roekchai²

¹Faculty of Medical technology, Huachiew Chalermprakiet University; ²National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract: HPA-21w is one of clinically important platelet antigen especially in Asian. HPA-21w frequency in Thai population has not been reported. **Objective:** To study HPA-21w genotype in platelet apheresis donors of National Blood Centre in order to be used as a preliminary data in clinical significant study. **Methods:** Three hundred and fourteen DNA samples obtained from platelet apheresis donors were included in this study. All DNA samples and known HPA-21w samples were genotyped for HPA-21 using PCR-SSP. Allele frequencies found in donors were calculated. **Results:** In this study, HPA-21a21a was found in 313 samples (99.68%) and HPA-21a21b was found in 1 sample (0.32%), however HPA-21b21b was not found. The allele frequencies of HPA-21a and HPA-21b were 0.998 and 0.002. DNA sequencing technique was used to confirm HPA-21a21b. **Discussions:** In this study, HPA-21a21a was found in most Thai donors while only one sample was HPA-21a21b, though HPA-21b21b was not found. However, additional samples should be studied in order to be used as prediction of alloimmunization against HPA-21.

Keywords : ● Human platelet antigens ● HPA-21w ● PCR-SSP ● Thai blood donors

J Hematol Transfus Med 2016;26:107-14.