

การคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด

ยุภากรณ์ สุตวิสัย¹, จินตนา พัวไพโรจน์², พัชร คำวิสัยศักดิ์³, อรุณรัฐ ร่มพุกษ^{4,5},
ชาญวิทย์ สีลาวัฒน์^{4,5}, อมรรัตน์ ร่มพุกษ^{2,5} *

Received: August 25, 2011

Revised & Accepted: September 30, 2011

บทคัดย่อ

แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดมีความสำคัญในการเกิดภาวะ neonatal alloimmune thrombocytopenia (NATP), post-transfusion purpura (PTP) และ platelet transfusion refractoriness การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดจึงมีความสำคัญในผู้ป่วยเหล่านี้ การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดจำเป็นต้องใช้เกล็ดเลือดที่ทราบชนิดแอนติเจนในการทดสอบ การศึกษาค้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือดในผู้บริจาคเกล็ดเลือดหมูโอ เพื่อคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานสำหรับการใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วย โดยตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือดจำนวน 7 ระบบ คือ HPA-1 ถึง HPA-6 และ HPA-15 ในตัวอย่างจำนวน 126 ราย ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP) ผลการศึกษาพบว่าแอนติเจนที่พบได้ในผู้บริจาคเกล็ดเลือดทุกรายคือ HPA-1a, -2a, -4a, -5a และ -6a ในขณะที่ HPA-1b, -2b, -5b และ -6b พบได้น้อย และไม่พบ HPA-4b ส่วน HPA-3a, -3b, -15a และ -15b มีความถี่ของยีนเป็นร้อยละเท่ากับ 52.4, 47.6, 59.1 และ 40.9 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลความถี่ของยีนที่ได้ไม่แตกต่างจากข้อมูลของชาวไทยและใกล้เคียงกับชาวเอเชียที่มีการศึกษามาก่อน เมื่อทำการคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานพบว่าจำนวน 3 รายที่มีแอนติเจนเหมาะสมสำหรับคัดกรองแอนติบอดี และจำนวน 9 รายสำหรับตรวจจำแนกแอนติบอดีชนิด HPA-1b, -2b, -3a, -3b, -5b, -6b, -15a และ -15b นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลแอนติเจนของเกล็ดเลือดในผู้บริจาคเกล็ดเลือด ที่นำไปใช้ในการเลือกเกล็ดเลือดที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: แอนติเจนของเกล็ดเลือด, แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด, เกล็ดเลือดมาตรฐาน

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

² คลังเลือดกลาง และ ³ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและเวชศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Selection of standard platelets for platelet antibody detection

Yupaporn Sudwilai¹, Chintana Paupairoj², Patcharee Komwilaisak³,
Arunrat Romphruk^{4,5}, Chanvit Leelayuwat^{4,5}, Amornrat V Romphruk^{2,5} *

Abstract

Platelet alloantibodies can cause neonatal alloimmune thrombocytopenia (NATP), post-transfusion purpura (PTP) and platelet transfusion refractoriness. Detection of these antibodies requires the standard platelets with known antigens. In this study, human platelet antigens (HPA) -1 to -6 and HPA-15 alleles were typed in 126 group O single donor platelets (SDP) using PCR with sequence specific primers (PCR-SSP). HPA-1a, -2a, -4a, -5a and -6a were present in all samples. HPA-1b, -2b, -5b, and -6b were rare and HPA-4b was not found. The gene frequencies of HPA-3a, -3b, -15a and -15b were 52.4 %, 47.6 %, 59.1 % and 40.9 %, respectively. The gene frequencies of HPA in this study were similar to those of previous studies in Thais and Asians population. For standard platelet selection, platelets from 3 donors were selected for platelet antibody screening test and 9 donors were selected for platelet antibody identification. This set of standard platelets can identify anti-HPA-1b, -2b, -3a, -3b, -5b, -6b, -15a and -15b. Moreover, the distribution of HPA genotypes in this study provides basic information on donor which will be useful for further searching of HPA- matched platelets for patients.

Keywords: Platelet antigens, Platelet alloantibody, Standard platelets

¹ Master degree student in Biomedical Sciences Program,

² Blood Transfusion Center, ³ Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,

⁴ Department of Clinical Immunology and Transfusion Sciences,

⁵ Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories,
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: aromphruk@gmail.com)

บทนำ

เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในกระบวนการห้ามเลือดของร่างกาย ดังนั้นเกล็ดเลือดจึงเป็นส่วนประกอบเลือดสำคัญที่รักษาอาการเลือดออกเนื่องจากภาวะเกล็ดเลือดต่ำ การที่ผู้ป่วยได้รับเกล็ดเลือดบ่อยครั้ง อาจมีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนเกล็ดเลือดที่ผู้ป่วยไม่มีขึ้น ส่งผลให้เกิดการทำลายเกล็ดเลือดที่ได้รับเข้าไป ทำให้อายุการทำงานของเกล็ดเลือดสั้นลง แอนติเจนบนผิวของเกล็ดเลือดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกคือแอนติเจนที่สามารถพบร่วมกันกับเซลล์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากเกล็ดเลือด (common antigens) เช่น แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงได้แก่แอนติเจน ABH, Lewis, Ii, P และแอนติเจนบนเม็ดเลือดขาวได้แก่ HLA class I กลุ่มที่สองคือแอนติเจนที่พบเฉพาะบนผิวของเกล็ดเลือด เรียกว่า Human platelet antigen (HPA) ปัจจุบันมีการพบ HPA แล้วจำนวน 21 ระบบและให้ชื่อเป็น HPA-1 ถึง HPA-21 มีลักษณะเป็นคู่อัลลีลซึ่งกันและกัน กำหนดเรียกเป็น a และ b โดยอัลลีล a จะพบได้บ่อยกว่าอัลลีล b จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HPA ที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนชนิดต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงกรดอะมิโน 1 ชนิด ซึ่งเป็นผลจากการมีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันเพียง 1 เบสเท่านั้น⁽¹⁻⁴⁾

แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ neonatal alloimmune thrombocytopenia (NATP), post-transfusion purpura (PTP), platelet transfusion refractoriness ภาวะ NATP มีสาเหตุจากการที่เกล็ดเลือดของทารกในครรภ์มี human platelet antigens (HPA) ที่ไม่เหมือนกับมารดา เช่นเด็กมีแอนติเจน HPA-1a แต่มารดาไม่มีแอนติเจน HPA-1a เมื่อมี fetomaternal transfusion หรือการที่เลือดทารกเข้าสู่กระแสเลือดของมารดา จึงกระตุ้นมารดาให้สร้าง anti-HPA-1a ได้ ซึ่งถ้าแอนติบอดีนี้นั้นเป็นชนิด IgG สามารถผ่านรกเข้าไปจับกับแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดของทารก ทำให้เกล็ดเลือดของทารกถูกทำลายโดยเซลล์แมคโครฟาจใน reticuloendothelial system เช่น ม้าม อาการทางคลินิกของโรคพบตั้งแต่ ไม่แสดงอาการจนถึงมีภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงตั้งแตอยู่ในครรภ์ ขณะคลอดหรือหลังคลอด ภาวะ PTP มีสาเหตุจากการที่ผู้ป่วยได้รับเลือดที่มีแอนติเจนบนผิวของเกล็ดเลือดไม่ตรงกัน ทำให้ผู้ป่วยมีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไป แอนติบอดีที่ผู้ป่วยสร้างขึ้นจะทำลายเกล็ดเลือด ทำให้เกิดอาการเลือดออก

อย่างรุนแรงได้ ภาวะ platelet transfusion refractoriness คือภาวะที่มีการให้เกล็ดเลือดในผู้ป่วยแล้วปริมาณเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นโดยมีค่า corrected count increment (CCI) ที่ 1 ชั่วโมงน้อยกว่า 7.5×10^9 เซลล์ต่อลิตร ซึ่งภาวะ platelet transfusion refractoriness นี้เป็นปัญหาสำคัญที่พบได้ในผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดบ่อยครั้ง โดยพบได้สูงประมาณร้อยละ 40 ถึง 70 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งที่จำเป็นต้องได้รับเกล็ดเลือดเป็นประจำ ผู้ป่วยกลุ่มนี้นอกจากจะพบ anti-HPA แล้วยังพบ anti-HLA ด้วย แต่พบ anti-HLA ได้บ่อยกว่า^(3, 5-7) ฉะนั้นการตรวจหา anti-HPA ในผู้ป่วยที่มีภาวะเหล่านี้จึงมีความสำคัญและจำเป็น เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุและติดตามการรักษา ตลอดจนการพิจารณาหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดนั้น จำเป็นต้องใช้เกล็ดเลือดที่ทราบชนิดแอนติเจนเป็นเกล็ดเลือดมาตรฐานสำหรับตรวจกรอง (screening platelets) และตรวจจำแนกชนิดของ anti-HPA (panel platelets) ซึ่งต้องเลือกจากเกล็ดเลือดของคนหมู่ออ จำนวน 8-10 ราย โดยแต่ละรายจะมีแอนติเจนที่แตกต่างกัน และอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนในการจำแนกชนิดของแอนติบอดีได้ การคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องทราบชนิดของแอนติเจนบนเกล็ดเลือดก่อน จึงจะสามารถคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานที่เหมาะสมได้

การตรวจหาชนิดแอนติเจนบนเกล็ดเลือดนั้นมีหลายวิธีด้วยกันเช่น polymerase chain reaction with fragment length polymorphism (PCR-RFLP), polymerase chain reaction with allele specific oligonucleotides (PCR-ASO) hybridization, polymerase chain reaction with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) และ polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP)⁽⁸⁻¹⁰⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้เทคนิค PCR-SSP สำหรับตรวจหาชนิดแอนติเจนของเกล็ดเลือดเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนน้อย มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ได้ตรวจหาชนิดแอนติเจนของเกล็ดเลือดจำนวน 7 ระบบในผู้ป่วยโรคเกล็ดเลือดหมู่โอ เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับคัดเลือกเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนเหมาะสม ว่าเป็นเกล็ดเลือดมาตรฐานสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคเกล็ดเลือด (single donor platelets) ซึ่งเป็นผู้บริจาคเกล็ดเลือดเป็นประจำของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 126 ราย โดยเป็นผู้ที่มีหมู่เลือดโอซึ่งไม่มีแอนติเจน A และ B บนเซลล์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการรบกวนปฏิกิริยาจาก anti-A, anti-B และ anti-AB ที่พบได้ในซีรัมคนหมู่ B, A และ O ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 5 มิลลิลิตรในสารกันเลือดแข็ง citrate phosphate dextrose และนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี guanidine-hydrochloride และตกตะกอนโดยใช้ alcohol ⁽¹¹⁾ ทำการเตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 100 ng/ml งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE531167)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน

เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบชนิดแอนติเจนของ HPA-1 ถึง 6 และ HPA-15 จำนวน 8 ราย ซึ่งได้จากคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Primers

การศึกษานี้ใช้ specific primers ตามที่มีผู้รายงานไว้แล้วดัง ตารางที่ 1 ^(10, 12, 13) จำนวนทั้งหมด 14 reactions แต่ละ reaction จะมี internal control primer ที่จะเพิ่มขยายยีน human growth hormone เพื่อให้มั่นใจว่าการทดสอบที่ให้ผลลบไม่ได้เกิดจากความผิดพลาดของการทำปฏิกิริยา PCR

Table 1 Nucleotide sequences of specific primers and internal control primers for HPA-1 to 6 and HPA-15 genotyping ^(10, 12, 13)

HPA	Specificity	Primer sequences (5' ----> 3')	Size (bp)	Conc. (mM)
HPA-1	1a	ACT TAC AGG CCC TGC CTC T	245	0.4
	1b	ACT TAC AGG CCC TGC CTC C		
	common	GTG CAA TCC TCT GGG GAC T		
HPA-2	2a	GCC CCC AGG GCT CCT GAC	258	0.5
	2b	GCC CCC AGG GCT CCT GAT		
	common	TCA GCA TTG TCC TGC AGC CA		
HPA-3	3a	GGA CTG GGG GCT GCC CAT	266	0.75
	3b	GGA CTG GGG GCT GCC CAG		
	Common	TCC ATG TTC ACT TGA AGT GCT		
HPA-4	4a	GCT GGC CAC CCA GAT GCG	120	0.5
	4b	GCT GGC CAC CCA GAT GCA		
	Common	CAG GGG TTT TCG AGG GCC T		
HPA-5	5a	AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AG	246	3.75
	5b	AGT CTA CCT GTT TAC TAT CAA AA		
	Common	CTC TCA TGG AAA ATG GCA GTA		

HPA	Specificity	Primer sequences (5' ----> 3')	Size (bp)	Conc. (mM)
HPA-6	6a	GAC GAG TGC AGC CCC CG	238	0.75
	6b	GGA CGA GTG CAG CCC CCA	239	1
	Common	CTATGTTTCCCAGTGGTTGCA		
HPA-15	15a	TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT GG	225	0.75
	15b	TTC AAA TTC TTG GTA AAT CCT GT		
	Common	ATG ACC TTA TGA TGA CCT ATT C		
Internal control	HGH I	CAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	439	0.1
	HGH II	ATCCACTCACGGATTTCTGTTGTGTT TC		

การทดสอบหาเอ็น HPA

ทดสอบหาเอ็นที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน HPA-1 ถึง 6 และ HPA-15 ด้วยเทคนิค PCR-SSP ส่วนผสมในแต่ละปฏิกิริยาฟิซอร์มีปริมาตรทั้งหมด 13 ml ประกอบด้วย DNA 100 ng, PCR buffer (67mM Tris HCl pH 8.8, 17 mM ammonium sulfate, 0.1% Tween 20, 200 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂), *Taq* DNA polymerase 0.5 units, ใช้ internal control primers ในปริมาณ 0.1 mM และ specific primers ปริมาณ 0.4-3.75 mM ความเข้มข้นตาม ตารางที่ 1 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR รุ่น GeneAmp PCR system 9700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) หรือ PXE 0.2 Thermocycler (Thermo Electron Corporation, Milford

City, MA, USA) โดย denature ที่อุณหภูมิ 96°ซ นาน 2 นาที ทำปฏิกิริยาที่ 96°ซ นาน 30 วินาที 66°ซ นาน 60 วินาที และ 72°ซ นาน 40 วินาที จำนวน 5 รอบ ทำปฏิกิริยาที่ 96°ซ นาน 30 วินาที 58°ซ นาน 60 วินาที และ 72°ซ นาน 40 วินาที จำนวน 21 รอบ ทำปฏิกิริยาที่ 96°ซ นาน 30 วินาที 55°ซ นาน 75 วินาที และ 72°ซ นาน 120 วินาที จำนวน 4 รอบ และที่อุณหภูมิ 72°ซ นาน 10 นาที นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปแยกด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ที่มี 0.5 mg/ml ethidium bromide ผสมอยู่ ภายใต้กระแสไฟฟ้า 300 โวลต์ เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator บันทึกผลที่ได้เพื่อนำไปแปลผล ดังตัวอย่างใน รูปที่ 1

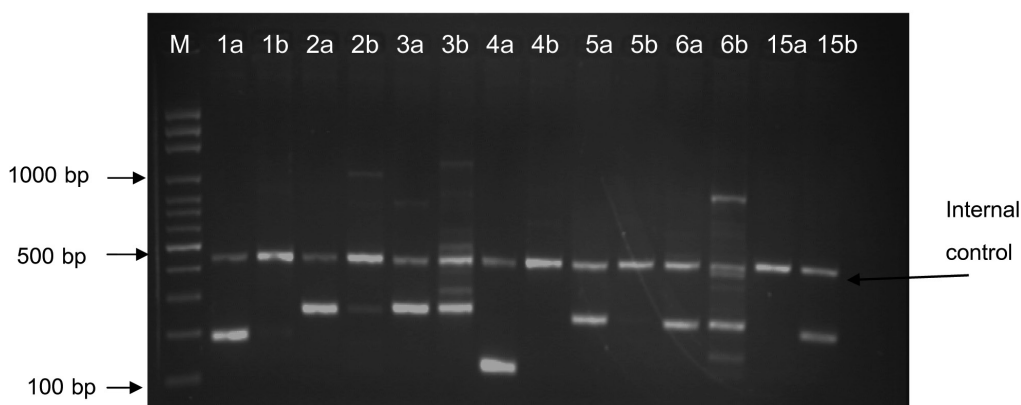


Figure 1 Gel electrophoresis of HPA genotyping using PCR-SSP. Lane M, 100 bp ladder marker; Lane 1a to 15b, each lane represents the PCR product of internal control and specific primers. The 439-bp amplification product of the HGH control primers is presented in all lanes, which shows that amplification has occurred optimally. The genotype was deduced from the presence or absence of amplification products specific for alleles. This sample shows HPA-1a1a, HPA-2a2a, HPA-3a3b, HPA-4a4a, HPA-5a5a, HPA-6a6b and HPA-15b15b genotypes.

การทดสอบ reproducibility

ทำการสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 10 รายที่ไม่ทราบผล genotyping ทำการทดสอบ HPA typing อีกครั้ง เพื่อดูผล reproducibility

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. คำนวณหาความถี่ของ HPA genotype จากสูตร

$$\% \text{ genotype frequencies} = \frac{\sum \text{จำนวนตัวอย่างที่พบ genotype นั้น}}{N} \times 100$$

2. คำนวณหาความถี่ของ HPA gene จากสูตร

$$\% \text{ gene frequencies} = \frac{\sum \text{จำนวนตัวอย่างที่พบ allele นั้น}}{2N} \times 100$$

เมื่อ N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

3. ทดสอบความแตกต่างความถี่ของแอนติเจนระหว่าง 2 กลุ่ม โดยใช้สถิติ Chi-square (X^2) และ Fisher's exact test

ผลการศึกษา

ผลการตรวจ HPA-typing

เมื่อใช้เทคนิค PCR-SSP ในการตรวจหา HPA typing โดยสุ่มในตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 10 ราย เพื่อดูผล reproducibility ของการทดสอบ พบว่าให้ผลตรงกันทุกราย จากการตรวจ HPA typing ในตัวอย่าง DNA ทั้งหมด 126 รายได้ผลดัง ตารางที่ 2 พบว่า HPA-1a, 2a, 4a, 5a และ 6a เป็นอัลลีลที่พบได้บ่อย และในทุกรายจะพบอัลลีล HPA-1a, -2a, -4a, -5a, -6a แต่ไม่พบ HPA-4b สำหรับ HPA-3 และ -15 ทั้งอัลลีล a และ b พบในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน คือ HPA-3a และ -3b พบร้อยละ 52.4 และ 47.6

ตามลำดับ ส่วน HPA-15a และ -15b พบ 59.1% และ 40.9% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในชาวไทยที่มีผู้รายงานมาก่อน^(10, 14, 15) ตาม ตารางที่ 3 พบว่าผลการศึกษาครั้งนี้ ความถี่ของยีน HPA ไม่แตกต่างกับการศึกษาในชาวไทยที่ผ่านมา และไม่แตกต่างกับชาวเอเชียด้วยกัน (ยกเว้น HPA-2b ที่พบในชาวเกาหลีและญี่ปุ่นได้สูงกว่า) แต่แตกต่างจากชาวผิวขาว โดยชาวผิวขาวมีความถี่ของยีน HPA-1b สูงกว่าชาวเอเชีย

การคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐาน

จากการตรวจหาแอนติเจน HPA-1 ถึง -6 และ -15 ในกลุ่มผู้บริจาคเกล็ดเลือดหมูโอ จำนวน 126 ราย เพื่อคัดเลือกเกล็ดเลือดที่ทราบชนิดแอนติเจนไว้เป็นเกล็ดเลือดมาตรฐาน สามารถคัดเลือกเกล็ดเลือดมาตรฐานจำนวน 3 ราย ที่มีแอนติเจนครอบคลุมตามที่ต้องการ สำหรับตรวจกรองแอนติบอดี (screening platelets) และจำนวน 9 ราย (panel platelets) สำหรับตรวจจำแนกชนิดแอนติบอดีชนิด HPA-1b, -2b, -3a, -3b, -5b, -6b, -15a และ -15b ในผู้ป่วย ดังแสดงใน ตารางที่ 4 และ 5 โดยพิจารณาตามการกระจายตัวของแอนติเจนระบบต่างๆ จากอุบัติการณ์ของแอนติเจน HPA พบว่าอัลลีล a จะพบได้บ่อยกว่าอัลลีล b จึงพิจารณาเลือกเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนของอัลลีล b เป็นหลักก่อน เช่น 1b, 2b เป็นต้น จากนั้นพิจารณาผลของ dosage effect เนื่องจากแอนติเจนของเกล็ดเลือดมีผลของ dosage effect โดยคนที่มี homozygous gene จะมีปริมาณของแอนติเจนมากกว่าคนที่มี heterozygous gene ดังนั้นจึงเลือกเซลล์ที่มี homozygous gene ก่อน แล้วจึงพิจารณาอุบัติการณ์ของแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่พบได้บ่อยในประชากร

Table 2 Genotype and gene frequencies of HPA in 126 single donor platelet samples

Genotype	No.	Genotype frequencies (%)	Gene	Gene frequencies (%)
HPA-1a1a	120	95.2	HPA-1a	97.6
HPA-1a1b	6	4.8	HPA-1b	2.4
HPA-1b1b	0	0.0		
HPA-2a2a	118	93.7	HPA-2a	96.8
HPA-2a2b	8	6.3	HPA-2b	3.2
HPA-2b2b	0	0.0		
HPA-3a3a	34	27.0	HPA-3a	52.4
HPA-3a3b	64	50.8	HPA-3b	47.6
HPA-3b3b	28	22.2		
HPA-4a4a	126	100.0	HPA-4a	100.0
HPA-4a4b	0	0.0	HPA-4b	0.0
HPA-4b4b	0	0.0		
HPA-5a5a	114	90.5	HPA-5a	95.2
HPA-5a5b	12	9.5	HPA-5b	4.8
HPA-5b5b	0	0.0		
HPA-6a6a	125	99.2	HPA-6a	99.6
HPA-6a6b	1	0.8	HPA-6b	0.4
HPA-6b6b	0	0.0		
HPA-15a15a	45	35.7	HPA-15a	59.1
HPA-15a15b	59	46.8	HPA-15b	40.9
HPA-15b15b	22	17.5		

Table 3 HPA gene frequencies in various populations

Population	No.	HPA- 1a	HPA- 1b	HPA- 2a	HPA- 2b	HPA- 3a	HPA- 3b	HPA- 4a	HPA- 4b	HPA- 5a	HPA- 5b	HPA- 6a	HPA- 6b	HPA- 15a	HPA- 15b	Reference
Thai (this study)	126	97.6	2.4	96.8	3.2	52.4	47.6	100.0	0.0	95.2	4.8	99.6	0.4	59.1	40.9	
Northeastern Thai	300	97.2	2.8	93.8	6.2	53.3	46.7	100.0	0.0	96.3	3.7	98.5	1.5	ND	ND	(10)
Thai	500	98.5	1.5	95.2	4.8	56.0	44.0	100.0	0.0	96.8	3.2	98.6	1.4	50.9	49.1	(14)
Thai	137	98.5	1.5	93.8	6.2	50.7	49.3	100.0	0.0	96.3	3.7	98.5	1.5	53.7	46.3	(15)
Indonesian	107	99.1	0.9	93.9	6.1	50.5	49.5	100.0	0.0	99.5	0.5	96.7	3.3	55.0	45.0	(15)
Vietnamese	107	98.6	1.4	95.3	4.7	48.6	51.4	100.0	0.0	97.2	2.8	98.6	1.4	47.7	52.3	(25)
Taiwanese	300	99.7	0.3	96.0	4.0	57.5	42.5	99.8	0.2	98.5	1.5	96.3	3.7	ND	ND	(26)
Taiwanese	566	99.8	0.2	96.1	3.9	59.5	40.5	99.8	0.2	98.1	1.9	98.0	2.0	53.8	46.2	(15)
Filipino	100	98.0	2.0	97.5	2.5	53.0	47.0	99.5	0.5	96.5	3.5	98.0	2.0	48.0	52.0	(15)
Hong Kongean	100	99.5	0.5	97.5	2.5	52.5	47.5	100.0	0.0	96.5	3.5	ND	ND	ND	ND	(27)
Korean	100	99.5	0.5	87.0	13.0*	67.0	33.0	100.0	0.0	97.0	3.0	ND	ND	ND	ND	(23)
Japanese	100- 300	99.8	0.2	89.8	10.2*	59.4	40.6	99.0	1.0	96.0	4.0	97.3	2.7	ND	ND	(28 & 29)
Chinese	1000	99.4	0.6	95.2	4.8	59.5	40.5	99.6	0.4	98.6	1.4	98.7	1.3	53.2	46.8	(30)
Dutch	200	84.6	15.4*	93.4	6.6	55.5	37.0	100.0	0.0	90.2	9.8	ND	ND	ND	ND	(31)
Finnish	200	86.0	14.0*	91.0	9.0	59.0	41.0	ND	ND	95.0	5.0	ND	ND	ND	ND	(32)
Welsh	392	82.5	17.5*	90.9	9.1	60.7	39.3	100.0	0.0	90.3	9.7	100.0	0.0	ND	ND	(33)
Australian	1000	85.8	14.2*	92.7	7.3	61.9	38.1	100.0	0.0	90.5	9.5	ND	ND	ND	ND	(34)
Norwegian	105	86.7	13.3*	94.3	5.7	47.1	52.9	100.0	0.0	92.9	7.1	ND	ND	50.5	49.5	(17)

ND = Not done * = gene frequencies showing the significant differences ($P < 0.05$) compared with this study

Table 4 Selected screening platelets for anti-HPA screening

Cell no	HPA													
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
3	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0
8	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+
9	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0

Table 5 Selected panel platelets for anti-HPA identification

Cell no	HPA													
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
1	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+
2	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0
3	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0
4	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0
5	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+
6	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+
7	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0
8	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+
9	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษาชนิดของ human platelet antigen (HPA) ทั้ง 7 ระบบ ในผู้ป่วยโรคเลือดของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในครั้งนี้ ใช้เทคนิค PCR-SSP ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็ว ขั้นตอนน้อย มีความถูกต้องและแม่นยำ เทคนิค PCR-SSP นี้ใช้กันมากในการตรวจหาแอนติเจนของเนื้อเยื่อ เช่น การตรวจ HLA DNA typing การตรวจ HLA-B*27 typing การตรวจ HLA-B*1502 typing หรือแม้แต่การตรวจหาฮีนหมู่เลือด ABO เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับ HPA typing นี้มีขั้นตอนการทดสอบและน่ายาต่าง ๆ ที่ใช้คล้ายคลึงกับการตรวจ HLA typing⁽¹⁶⁾ จึงสะดวกต่อการใช้งานและการควบคุมคุณภาพของน่ายา อย่างไรก็ตาม specific primer สำหรับตรวจหาฮีน HPA-2b ครั้งนี้จะให้ผลบวกอ่อน ๆ กับทุกตัวอย่างที่มีฮีน HPA-2a2a

ในขณะที่ในตัวอย่างที่พบ HPA-2b จะให้ผลบวกที่แรงมาก (8+)

จากผลการตรวจหา HPA ทั้ง 7 ระบบ พบว่า HPA-1a, -2a, -3a, -4a, -5a, -6a และ -15a เป็น อัลลีลที่พบได้บ่อยเช่นเดียวกับการศึกษาในชนชาติต่างๆที่ผ่านมา^(14, 15, 17) ดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 3

จากการศึกษาของ ภาวินีและคณะ พบว่าแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่พบในผู้ป่วยชาวไทยที่มีปัญหาเกล็ดเลือดต่ำ ได้แก่ anti-HPA-5b, -2b และ -3a⁽¹⁸⁾ ในขณะที่ anti-HPA-1a เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ NATP และ PTP ได้บ่อยที่สุดในประชากรผิวขาว แต่ anti-HPA-1a มีโอกาสน้อยที่จะเป็นสาเหตุของ NATP และ PTP ในชาวไทย เนื่องจากพบแอนติเจน HPA-1a ได้ในอัตราที่สูงมาก มีรายงานว่าพบ anti-HPA-1b, -2a, -2b, -3a, -3b, -4a, -4b, -5a, -6a, -15a

และ -15b ในผู้ป่วย NATP, PTP และ platelet transfusion refractoriness ชาวผิวขาวและชาวญี่ปุ่น⁽¹⁹⁻²⁴⁾ แต่จากรายงาน การตรวจหาแอนติเจน HPA ในชาวไทยทั้งหมดที่ผ่านมา^(10, 14, 15) แอนติเจน HPA-1a, -4a, -4b, -5a และ HPA-6a มี โอกาสน้อยที่จะเป็นสาเหตุของ NATP, PTP และ platelet transfusion refractoriness เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวพบ ได้ในอัตราที่สูงมากในชาวไทย ยกเว้น HPA-4b ซึ่งยังไม่พบ ในชาวไทย นอกจากนี้ HPA-1b ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบร้อยละ 2.4 คล้ายกับชาวเอเชีย (ร้อยละ 0.2-2.8) แต่แตกต่าง จากชาวผิวขาว (ร้อยละ 13.3-17.5) จึงมีโอกาสพบ anti-HPA-1b ในชาวผิวขาวได้สูงกว่าชาวเอเชีย สำหรับแอนติเจน HPA-2b ในรายงานนี้ นั้นพบในอัตราที่ต่ำกว่าในชาวเกาหลี และชาวญี่ปุ่น ซึ่งมีรายงานว่าพบ HPA-2b สูงกว่าชาวเอเชีย ชาตินี้ จึงมีโอกาสสร้าง anti-HPA-2b ในสองชนชาติที่สูง กว่าชนชาวเอเชียชาติอื่นๆ

จากการศึกษาหาแอนติเจน HPA-1 ถึง -6 และ -15 ในกลุ่มผู้บริจาคเกล็ดเลือดหมู่โอจำนวน 126 ราย เพื่อ คัดเลือกเกล็ดเลือดที่ทราบชนิดแอนติเจนไว้เป็นเกล็ดเลือด มาตรฐาน สำหรับตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วย โดยอาศัย หลักพิจารณาตามการกระจายของแอนติเจนก่อน ซึ่งจาก อุบัติการณ์ของแอนติเจนเหล่านี้ในคนไทย พบว่าโอกาสที่ จะพบแอนติเจน HPA-1b, -2b, -5b และ -6b ค่อนข้าง น้อย จึงเลือกเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนเหล่านี้ก่อน จากนั้นก็ พิจารณาผลของ dosage effect โดยจะเลือกเกล็ดเลือดที่มี homozygous gene ก่อน แต่ในการศึกษานี้สามารถเลือก เกล็ดเลือดที่มี homozygous gene ได้เพียง HPA-1a1a, -2a2a, -3a3a, -3b3b, -4a4a, -5a5a, -6a6a, -15a15a และ -15b15b เท่านั้น จึงจำเป็นต้องเลือกเกล็ดเลือดที่มี heterozygous gene ได้แก่ HPA-1a1b, -2a2b, -5a5b และ HPA-6a6b โดยสรุปได้เกล็ดเลือดมาตรฐานสำหรับ ตรวจกรองแอนติบอดีและสำหรับตรวจแยกชนิดแอนติบอดี จำนวน 3 รายและ 9 ราย ตามตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอุบัติการณ์ในการพบแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ในประชากรไทย จากที่เคยมีรายงานพบเพียง anti-HPA-5b, -2b และ -3a⁽¹⁸⁾ ซึ่ง panel platelets ที่ดัดนั้น ควรจำแนก ชนิดของแอนติบอดีที่พบได้บ่อยในประชากรนั้นๆ ได้ดี ดังนั้น panel platelets ที่คัดเลือกมานี้ใช้จำแนกชนิดของแอนติบอดี ที่พบได้บ่อยในประชากรไทยได้ และยังใช้จำแนกแอนติบอดี ชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย ได้แก่ anti-HPA-1b, -2b, -3a, -3b,

-5b, -6b, -15a และ -15b

การตรวจหาชนิดแอนติเจนของเกล็ดเลือด โดยใช้ เทคนิค PCR-SSP ในครั้งนี้ นอกจากจะใช้คัดเลือกเกล็ด เลือดสำหรับใช้เป็นเกล็ดเลือดมาตรฐาน ในการตรวจหา แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยแล้ว ยังได้ข้อมูลชนิด แอนติเจนของเกล็ดเลือดของผู้บริจาคเกล็ดเลือดแต่ละราย ที่นำไปใช้คัดเลือกหรือค้นหาเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ ป่วย อันจะมีผลทำให้การรักษาผู้ป่วยมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ หลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิต วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากกองทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ของบัณฑิต วิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang 2003; 85: 240-5.
2. Stafford P, Garner SF, Rankin A, Kekomaki R, Watkins NA, Ouwehand WH. A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Va (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia. Transfusion 2008; 48: 1432-8.
3. Bertrand G, Martageix C, Jallu V, Vitry F, Kaplan C. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia. J Thromb Haemost 2006; 4: 628-37.
4. Peterson JA, Gitter ML, Kanack A, Curtis B, McFarland J, Bougie D, et al. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia.

- Transfusion 2010; 50: 324-33.
5. Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 2001; 41: 766-70.
 6. Schnaidt M, Northoff H, Wernet D. Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA-immunized haematologic-oncologic patients. *Transfus Med* 1996; 6: 111-4.
 7. Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang* 2004; 87 Suppl1: 82-6.
 8. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang* 2002; 83: 1-12.
 9. Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med* 1997; 7: 41-5.
 10. Romphruk AV, Akahat J, Srivanichrak P, Puapairoj C, Romphruk A, Leelayuwat C. Genotyping of human platelet antigens in ethnic Northeastern Thais by the polymerase chain reaction-sequence specific primer technique. *J Med Assoc Thai* 2000; 83: 1333-9.
 11. Bowtell DD. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal Biochem* 1987; 162: 463-5.
 12. Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A. Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay. *Vox Sang* 2005; 88: 271-4.
 13. Tomicic M, Bingulac-Popovic J, Drazic V, Hundric-Haspl Z. Frequency of HPA-15a and HPA-15b (Gov a/b) human platelet alloantigens in the Croatian population. *Arch Med Res* 2006; 37: 172-4.
 14. Kupatawintu P, Nathalang O, R OC, Patmasiriwat P. Gene frequencies of the HPA-1 to 6 and Gov human platelet antigens in Thai blood donors. *Immunohematology* 2005; 21: 5-9.
 15. Shih MC, Liu TC, Lin IL, Lin SF, Chen CM, Chang JG. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations. *Int J Mol Med* 2003; 12: 609-14.
 16. Romphruk AV, Romphruk A, Kongmaroeng C, Klumkrathok K, Paupairoj C, Leelayuwat C. HLA class I and II alleles and haplotypes in ethnic Northeast Thais. *Tissue Antigens* 2010; 75: 701-11.
 17. Randen I, Sorensen K, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J. Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis. *Transfusion* 2003; 43: 445-50.
 18. Kupatawintu P, Jitjak N, Saelee S, O-Charoen R, Nathalang O. The Incidence of platelet antibody in Thrombocytopenic Patients. *Thai J Hematol Transf Med* 2000; 10: 123-7.
 19. Shibata Y, Matsuda I, Miyaji T, Ichikawa Y. Yuka, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1986; 50: 177-80.
 20. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion* 2005; 45: 366-73.
 21. Berry JE, Murphy CM, Smith GA, Ranasinghe E, Finberg R, Walton J, et al. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *Br J Haematol* 2000; 110: 735-42.
 22. Panzer S, Auerbach L, Cechova E, Fischer G, Holensteiner A, Kitl EM, et al. Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *Br J Haematol* 1995; 90: 655-60.

23. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, White, and Korean populations. *Transfusion* 1995; 35: 863-7.
24. Okada N, Oda M, Sano T, Ito J, Shibata Y, Yamanaoka M. Intracranial hemorrhage in utero due to fetomaternal Bak(a) incompatibility. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1988; 51: 1086-91.
25. Halle L, Bach KH, Martageix C, Bianchi F, Le TKT, Morel-Kopp MC, et al. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue Antigens* 2004; 63: 34-40.
26. Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, Lin JS, Tzeng CH. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion* 2002; 42: 1089-95.
27. Chang YW, Mytilineos J, Opelz G, Hawkins BR. Distribution of human platelet antigens in a Chinese population. *Tissue Antigens* 1998; 51 (4 Pt 1): 391-3.
28. Fujiwara K, Isa K, Oka T, Maekawajiri S, Yamane A, Akaza T, et al. Large-scale DNA typing for human platelet alloantigens by PCR-PHFA (preferential homoduplex formation assay). *Br J Haematol* 1996; 95: 198-203.
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.
30. 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.
31. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81: 835-40.
32. Kekomaki S, Partanen J, Kekomaki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med* 1995; 5: 193-8.
33. Sellers J, Thompson J, Guttridge MG, Darke C. Human platelet antigens: typing by PCR using sequence-specific primers and their distribution in blood donors resident in Wales. *Eur J Immunogenet* 1999; 26: 393-7.
34. Bennett JA, Palmer LJ, Musk AW, Erber WN. Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia. *Transfus Med* 2002; 12: 199-203.