นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA Class ที่ 1 ในสตรีไทยที่ตั้งครรภ์ 2,000 ราย ที่ รพ. จุฬาลงกรณ์*

ปรียาจิต เจริญวงศ์**
อรทัย กังวาลชิรธาดา** ไพโรจน์ วิฑูรพาณิชย์***

Charoenwongse P, Kangwalshiratada O, Witoonpanich P. A study of HLA Class I antibodies in 2,000 Thai pregnant women at Chulalongkorn Hospital. Chula Med J 1987 Jun; 31 (6) : 465-472

Sera from 2,000 pregnant women regardless of parity were collected at the Department of Obstetrics - Gynecology, Chulalongkorn Hospital and were tested against panel cells of known HLA antigens. Panel of lymphocytes were constructed from 41 HLA-typed persons, chosen to represent the widest possible variety of HLA-A and HLA-B antigens.

The sera were screened by the two-stage microlymphocytotoxicity test. Of the 2,000 sera screened, 254 (12.7%) showed antibody activity. Of these 97 (4.85%) reacted with "Blank" panel cells. Seventy-eight (3.90%) were considered two or three multispecific because they reacted with more than one-half of the cells in the panel. Only 57 (2.85%) were found to be monospecific, representing 13 specificities. The common anti HLA for A and B loci are Anti-A2, Anti-A9, Anti-B5 and Anti-B15 respectively. The incidence of lymphocytotoxic antibodies significantly increases with parity ($p < 0.005$).

Reprint requests : Charoenwongse P. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publications. December 1, 1986.

---

* ได้รับทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2525 เสนอในการประชุมวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พฤษภาคม 2529

** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระบบ Major Histocompatibility Complex ในคนหรืออีกชื่อหนึ่งที่นิยมเรียกคือ Human Leukocyte Locus A (HLA) นี้เป็นกลุ่มของยีนส์ที่เป็นตัวกำหนดและควบคุมลักษณะของแอนติเจนที่ปรากฏบนผิวเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยอมรับหรือไม่ยอมรับอวัยวะที่นำมาปลูกถ่ายให้ จึงมีบทบาทสำคัญต่อการปลูกถ่ายอวัยวะ (Organ transplantation) รวมทั้งการได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือด โดยเฉพาะเกร็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยีนส์ในกลุ่มนี้ยังมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับยีนส์ที่ควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response genes)[1] จึงได้มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคต่าง ๆ กับระบบ HLA (HLA and disease association) กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน[2] ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกของการเกิดโรคได้อย่างลึกซึ้งยิ่งขึ้น ตลอดจนสามารถนำมาช่วยในการวินิจฉัย และเลือกแนวทางการรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องอีกด้วย

ระบบ HLA นี้จัดว่าเป็นระบบที่มี polymorphism มากที่สุดเท่าที่มนุษย์เคยพบมา สามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีและหน้าที่ออกเป็น HLA Class 1 ซึ่งประกอบด้วยโลคัส HLA-A, HLA-B, HLA-C และ HLA Class 2 ซึ่งประกอบด้วยโลคัส HLA-D, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ[3] ในแต่ละโลคัสยังประกอบไปด้วย allele ซึ่งเมื่อรวม allele ของทุก ๆ โลคัสเข้าด้วยกัน จะมีแอนติเจนได้ถึง 120 ชนิดในปัจจุบัน[4] ฉะนั้นในการศึกษาแอนติเจนของ HLA Class 1 (HLA-A,B,C) และ HLA Class 2 (HLA-DR, DQ) ที่ตรวจหาโดยอาศัย Serologically defined นั้น สิ่งที่สำคัญที่สุด คือ แอนติบอดีย์ที่จะใช้เป็น Typing sera ซึ่งควรจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. Typing sera ควรเป็นแอนติบอดีย์ที่ได้มาจากชนชาติเดียวกัน เพื่อความถูกต้องแน่นอนในการแปรผลแอนติเจน ทั้งนี้เพราะแอนติเจนของระบบ HLA จะมีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ[5]

2. Typing sera ที่ดีควรเป็น monospecific sera และจะต้องมีความแรงพอที่จะทำให้เกิดผลบวกได้ 100% ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอม (false negative) ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลได้

แอนติบอดีย์ของระบบ HLA อาจตรวจพบได้จากหลายแหล่ง แต่แหล่งเดียวเท่านั้นที่จะตรวจหาแอนติบอดีย์ที่มีคุณภาพดีเหมาะสมที่จะใช้เป็น Typing sera ได้มากมายหลายชนิด เพื่อตรวจหาแอนติเจนของแต่ละโลคัสให้ครบถ้วน และเกิด 'blank' (unknown antigen) น้อยที่สุด ทั้งยังเป็นวิธีการที่สะดวกและประหยัดที่สุดอีกด้วย นั่นคือการตรวจหาแอนติบอดีย์ในสตรีที่ตั้งครรภ์[6,7,8]

แต่เนื่องจากเป็นระยะเริ่มแรกของการจัดตั้งห้องปฏิบัติการ Tissue Typing ขึ้นที่หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงมีความพร้อมและเหมาะสมที่จะทำการศึกษาเฉพาะแอนติบอดีย์ของระบบ HLA Class 1 (HLA-A,B) ในสตรีไทยที่ตั้งครรภ์ 2,000 ราย ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น ซึ่ง Typing sera ที่ตรวจหาได้นั้นนอกจากจะสามารถนำมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในงานบริการด้าน Tissue Typing เช่นการคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมสำหรับการปลูกถ่ายไตให้กับผู้ป่วย, ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ HLA กับโรคต่าง ๆ ซึ่งกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันแล้ว ยังอาจนำไปแลกเปลี่ยน' (exchange sera program) กับแอนติบอดีย์ชนิดที่ยังขาดแคลนอยู่กับห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทั่วโลกอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. แหล่งของแอนติบอดีย์ของระบบ HLA

ซีรั่มที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA เป็นซีรั่มที่ได้มาจากสตรีไทยจำนวน 2,000 ราย ที่มาฝากครรภ์ที่ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในระหว่างเดือนตุลาคม 2525 ถึงเดือนมีนาคม 2527 รวมเวลาทั้งสิ้น 1 ปี 6 เดือน โดยทำการเจาะเลือดรายละ 50 ml เมื่อเลือดแข็งตัวแล้วจึงทำการปั่นแยกซีรั่ม และใส่ sodium azide เพื่อป้องกันมิให้แบคทีเรียเจริญเติบโต (final dilution 0.01%) จากนั้นจึงเก็บซีรั่มไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 70° C โดยแยกเก็บเป็น 2 ชุดคือ

ชุดที่ 1 เก็บซีรั่มส่วนใหญ่ทั้งหมดไว้ในหลอดพลาสติก เพื่อเก็บไว้ทำเป็น lyophilized antibody เมื่อตรวจพบว่ามีแอนติบอดีย์ที่มีคุณภาพดีพอที่จะใช้เป็น Typing sera ได้

ชุดที่ 2 เก็บซีรั่ม 200 μl ไว้ใน microfuge tube เมื่อจะทำการตรวจหาแอนติบอดีย์ ก็นำซีรั่มนี้มาหยดลงใน microtest plate (ซึ่งหยด mineral oil ป้องกันการระเหยของซีรั่มแล้วหลุมละ 4 μl) หลุมละ 1 μl 1 หลุมต่อซีรั่มสตรีที่ตั้งครรภ์ 1 ราย ฉะนั้น microtest plate 1 tray (60 หลุม) จะใส่ซีรั่มสตรีที่ตั้งครรภ์ได้ 58 ราย และจะใส่ negative control sera และ positive control sera ในหลุมที่ 59 และ 60 จากนั้นจึงนำ microtest

plate นี้ไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 40° C

2. ลิมโฟซัยท์ที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA

เซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ใช้เป็นเซลล์หลักในการตรวจหาแอนติบอดีย์ ที่เรียกว่า "panel cell" นั้นได้มาจากแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่และคนงานที่ทำงานอยู่ในโรงพยาบาลจุฬาฯ ซึ่งได้ผ่านการทำ HLA typing จากศูนย์ Scandiatransplant มหาวิทยาลัย Arhus ประเทศเดนมาร์ค และทำการตรวจหาแอนติเจนของระบบ HLA ที่พบได้เฉพาะในคน Oriental เพิ่มเติมเช่น HLA-Bw 46 เป็นต้นที่ห้องปฏิบัติการ Tissue Typing ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นจึงแบ่ง panel cell ออกเป็น 2 ชุด ซึ่งเซลล์ในแต่ละชุดจะต้องมี known common antigen ที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีย์ได้เกือบครบทุกชนิด และควรมี panel อย่างน้อยที่สุด 2-3 คนต่อแอนติเจน 1 ชนิด นอกจากนั้นก็ควรมี blank ซึ่งเป็น unknown antigen อยู่ด้วย ซึ่งอาจทำให้สามารถค้นพบแอนติเจนชนิดใหม่ได้ในอนาคต

เซลล์ลิมโฟซัยท์นี้จะถูกแยกออกจาก defibrinated blood ของ panel โดยใช้วิธี standard Ficoll-Hypaque gradient centrifugation ของ Boyum[9] จากนั้นก็ตรวจสอบ viability ของเซลล์โดยใช้ 0.4% trypan blue ซึ่งควรได้ค่า viability สูงกว่า 90% แล้วจึงปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 2.5×10^6 เซลล์/ซีซี.

3. วิธีการตรวจหาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA

ใช้หลักการของ standard two stage microlymphocytotoxicity test[10] คือ ถ้าในซีรั่มที่นำมาตรวจสอบมีแอนติบอดีย์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนตัวใดตัวหนึ่งบนเซลล์ลิมโฟซัยท์ แอนติบอดีย์นั้นก็จะทำให้ปฏิกิริยากับแอนติเจนและมีการตรึงคอมพลีเมนท์เข้าร่วมในปฏิกิริยา เป็นผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย สีจึงสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้เห็นเซลล์ที่ตายติดสี และขนาดบวมโตกว่าเซลล์ปกติ 2-3 เท่า แต่ถ้าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น จะเห็นเซลล์ที่มีชีวิตมีลักษณะแวววาว และไม่ติดสี ขั้นตอนการทดสอบแสดงไว้ใน table 1

การอ่านผลของปฏิกิริยาจะอ่านเป็นร้อยละของเซลล์ที่ตาย และให้ระดับความแรงของปฏิกิริยาตามรายละเอียดใน table 2 สำหรับการแปลผลจะถือว่าเป็นปฏิกิริยาบวกเมื่อเซลล์ตายมากกว่า 20% หรือมีระดับความแรงของปฏิกิริยาเท่ากับ 2 ขึ้นไป และจะคัดเลือกเฉพาะซีรั่มที่ให้ผลบวกมากกว่า 50% หรือมีระดับความแรงของปฏิกิริยาเท่ากับ 6 ขึ้นไปมาทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกเป็น typing sera ต่อไป

Table 1 Two stage microlymphocytotoxicity test (NIH technique).

STAGE I	
ANTISERUM	1 µl
LYMPHOCYTE (2.5×10^6 cells/ml)	1 µl
INCUBATION, 20° -25° C	30 MIN
STAGE II	
RABBIT COMPLEMENT	5 µl
INCUBATION, 22° -25° C	60 MIN
STAINING	
5% EOSIN Y	3 µl
INCUBATION WITH DYE, 22° -25° C	5 MIN
40% FORMALIN, pH 7.2	8 µl

Table 2 Reading score

% killing cell	score
0 – 19	1
20 – 29	2
30 – 49	4
50 – 79	6
80 – 100	8

4. การวิเคราะห์แอนติบอดีย์ของระบบ HLA

Kissmeyer Nielsen และคณะ[11] ได้ดัดแปลงระบบ Punch card เพื่อให้เหมาะสมแก่การวิเคราะห์แอนติเจนและแอนติบอดีย์ของระบบที่มี polymorphism[12] อย่างระบบ HLA ลักษณะของการ์ดเป็นแผ่นกระดาษสี่เหลี่ยมมีตัวเลขเขียนอยู่ในวงกลม 10 แถว (แถวละ 10 หมายเลข) เรียงกันจาก 0 ถึง 99 หมายเลขแต่ละตัวจะหมายถึง เลขหมายประจำตัวของ Panel แต่ละคน Punch card system นี้จะมีการ์ดอยู่ 2 ประเภทคือ

1) Known antigen card เป็นการ์ดสำหรับแอนติเจนแต่ละชนิด การ์ด 1 แผ่นต่อแอนติเจน 1 ชนิด ตัวอย่างเช่น Panel เบอร์ 24, 29, 36 และ 41 มีแอนติเจน HLA-A1 การ์ดของแอนติเจน A1 จะถูกเจาะรูที่หมายเลข 24, 29, 36 และ 41 ตามลำดับ

2) Unknown serum card เป็นการ์ดสำหรับซีรั่มที่จะทำการวิเคราะห์ การ์ด 1 แผ่นต่อซีรั่ม 1 หมายเลข ตัวอย่างเช่น ซีรั่มเบอร์ 955 ให้ผลบวกกับ Panel เบอร์ 24, 29, 36 และ 41 ดังนั้นการ์ดประจำซีรั่มเบอร์ 955 จะถูกเจาะรูที่หมายเลข 24, 29, 36 และ 41 ส่วนหมายเลข panel ที่เหลือซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยากับซีรั่มนี้จะถูกทาสีแดงในวงกลมที่ล้อมรอบหมายเลขดังกล่าว

4.1 หลักการแยกประเภทแอนติบอดีย์

เมื่อจัดทำการ์ดทั้ง 2 ประเภทเรียบร้อยแล้ว ก็จะนำการ์ดซีรั่มมาเปรียบเทียบดูกับการ์ดแอนติเจนแต่ละชนิดที่สงสัยว่าจะมีความจำเพาะต่อกัน โดยการวางการ์ดแอนติเจนซ้อนกับแผ่นการ์ดซีรั่ม แล้วพิจารณาดังนี้คือ

ก. ถ้าการ์ดซีรั่มใดมีตำแหน่งและจำนวนรูที่เจาะตรงกับการ์ดแอนติเจนชนิดใดก็แสดงว่าซีรั่มเบอร์นั้นมีแอนติบอดีย์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้น และแอนติบอดีย์ชนิดนี้น่าจะเป็น Monospecific sera

ข. ถ้าการ์ดซีรั่มใดมีจำนวนรูที่เจาะมากกว่าการ์ดแอนติเจนที่สงสัย แต่รูส่วนหนึ่งมีตำแหน่งตรงกันกับแอนติเจนชนิดนั้นพอดี ก็แสดงว่าซีรั่มเบอร์นั้นมีแอนติบอดีย์มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจะต้องทำการพิจารณาต่อไปว่าจำนวนและตำแหน่งของรูส่วนเกินนั้นตรงกับของแอนติเจนชนิดใด และแอนติบอดีย์ชนิดนี้น่าจะเป็น Multispecific sera

ค. ถ้าการ์ดซีรั่มใดมีจำนวนและตำแหน่ง ตรงกับการ์ดแอนติเจน ที่มี Blank (Unknown antigen) ก็จะไม่สามารถบอกชนิดของแอนติบอดีย์ได้ และแอนติบอดีย์เหล่านี้จะจัดเป็น Unidentified sera เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70° C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไปในภายหน้า

4.2 หลักการวิเคราะห์แอนติบอดีย์

การที่จะบอกว่าแอนติบอดีย์ตัวใดเป็น monospecific หรือมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นจริง จำเป็นต้องอาศัยการยืนยันด้วยการหาค่า X^2 พร้อมกับ Yates' correction และค่า correlation coefficient (R) ซึ่งทำได้โดยนำการ์ดซีรั่มมาเปรียบเทียบดูกับการ์ดแอนติเจนที่คิดว่าจะมีความจำเพาะต่อกัน แล้วนับค่าของ a,b,c และ d นำมาลงใน 2 × 2 contingency table

		known antigen		total
		Pos	Neg	
unknown serum	Pos	a	b	C
	Neg	c	d	D
total		A	B	N

a(+/+) = จำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกกับซีรั่มที่ทำการวิเคราะห์และเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่มีแอนติเจน ที่เชื่อว่ามีความจำเพาะต่อซีรั่ม

b(+/−) = จำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกกับซีรั่มที่ทำการวิเคราะห์ ทั้งที่เซลล์เหล่านี้ไม่มีแอนติเจนที่คิดว่าจำเพาะต่อซีรั่ม

c(−/+) = จำนวนเซลล์ที่ให้ผลลบกับซีรั่ม ที่ทำการวิเคราะห์ ทั้งที่เซลล์เหล่านี้มีแอนติเจนที่คิดว่าจำเพาะต่อซีรั่ม

d(−/−) = จำนวนเซลล์ที่ให้ผลลบกับซีรั่มที่ทำการวิเคราะห์ และเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนที่เชื่อว่ามีความจำเพาะต่อซีรั่ม

จากนั้นก็นำค่า a, b, c และ d นี้มาวิเคราะห์ทางสถิติดังนี้

1. หาค่า X^2 โดยใช้ 2 × 2 contingency table พร้อมทั้ง Yates' correction ค่า X^2 ยิ่งมาก แสดงถึงความจำเพาะของแอนติบอดีย์ที่มีต่อแอนติเจนชนิดนั้น

$$X^2 \text{ (Yates')} = \frac{(|ad - bc| - N/2)^2 \times N}{A \times B \times C \times D}$$

2. การหาค่า correlation coefficient (R value) ซึ่งจะมีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 ถ้า R value มีค่าใกล้ +1 มากเท่าไร ก็ยิ่งแสดงถึงคุณภาพที่ดีเยี่ยมของแอนติบอดีย์นั้น

$$\text{correlation coefficient, } R = \sqrt{\frac{X^2}{N}}$$

ผลการวิจัย

1. โอกาสในการตรวจพบแอนติบอดีย์ของระบบ HLA จะสูงขึ้นตามจำนวนครั้งของการตั้งครรภ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) คือพบแอนติบอดีย์สูงถึง 27.27% ในสตรีที่ตั้งครรภ์ครั้งที่ 4 เมื่อเทียบกับสตรีที่ตั้งครรภ์แรก ซึ่งตรวจพบได้เพียง 7.23% เท่านั้น ตามรายละเอียดใน Table 3

Table 3 HLA antibodies in Thai pregnant women according to number of pregnancies

No. of pregnancies	No. of pregnant women	No. of women with cytotoxic antibody	X^2
1	899	65 (7.23%)	
2	636	89 (13.99%)	59.75
3	319	65 (20.38%)	$p < 0.005$
4	88	24 (27.27%)	

2. ประเภทและจำนวนแอนติบอดีย์ของระบบ HLA ที่ตรวจพบ

จากการตรวจหาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA ในซีรั่มสตรีที่ตั้งครรภ์จำนวน 2000 ราย ได้ผลโดยสรุปดังนี้คือ (Table 4)

Table 4 Serological characteristic of HLA antisera detected in Thai pregnant women 2,000 cases.

Type of HLA antisera		No. of Anti HLA		%	
MONOSPECIFIC	typing sera	57	79	2.85	3.95
	non-typing sera	22		1.10	
MULTISPECIFIC SERA			78		3.90
UNIDENTIFIED SERA			97		4.85
total			254		12.70

ก. พบซีรั่มที่ให้ผลบวกมากกว่า 20% (ระดับความแรงตั้งแต่ 2 ขึ้นไป) จำนวนทั้งสิ้น 254 sera คิดเป็นร้อยละ 12.7 แบ่งออกเป็น

– ซีรั่มที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน (Identified sera) จำนวน 157 sera คิดเป็นร้อยละ 7.85

– ซีรั่มที่ไม่สามารถหาความจำเพาะต่อแอนติเจนได้ (Unidentified sera) จำนวน 97 sera คิดเป็นร้อยละ 4.85

ข. Identified sera ที่ตรวจพบสามารถแยกออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

– Monospecific sera จำนวน 79 sera คิดเป็นร้อยละ 3.95

– Multispecific sera จำนวน 78 sera คิดเป็นร้อยละ 3.90

ค. ตรวจพบแอนติบอดีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะเป็น Typing sera เพียง 57 sera หรือร้อยละ 2.85% แบ่งออกเป็น

– แอนติบอดีย์ของ HLA - A 4 ชนิด รวม 23 sera คือ

Anti - A 1 = 1 sera

Anti - A 2 = 16 sera
Anti - A 9 = 4 sera
Anti - A 11 = 2 sera

– แอนติบอดีย์ของ HLA - B 8 ชนิด รวม 34 sera คือ

Anti - B 5 = 9 sera
Anti - B 7 = 6 sera
Anti - B 8 = 1 sera
Anti - B 13 = 9 sera
Anti - B 15 = 2 sera
Anti - B 17 = 2 sera
Anti - B 27 = 3 sera
Anti - B 40 = 2 sera

วิจารณ์ผล

1. ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าโอกาสในการตรวจพบแอนติบอดีย์สูงขึ้นตามจำนวนครั้งของการตั้งครรภ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) กล่าวคือสตรีที่ตั้งครรภ์ครั้งที่ 4 ตรวจพบแอนติบอดีย์ได้ถึง 27.27% ซึ่งสูงกว่าสตรีที่ตั้งครรภ์ครั้งแรกถึง 3.77 เท่า จึงสอดคล้องกับที่ Terasaki และคณะ[13] ได้ให้ข้อสังเกตไว้ว่า โอกาสที่จะตรวจพบแอนติบอดีย์ในสตรีที่มีบุตรหลายคนจะสูงกว่าในสตรีที่ตั้งครรภ์ครั้งแรก และผลที่ได้นี้ก็สนับสนุนที่มีผู้เคยรายงานไว้ว่าสามารถจะตรวจพบแอนติบอดีย์ประมาณ 10% ในสตรีที่ตั้งครรภ์ครั้งแรก[14] และสูงขึ้นถึง 20-30% ในการตั้งครรภ์ครั้งที่ 2 และ 3[15] อีกด้วย แต่เนื่องจากระยะ 3-4 ปีนี้ รัฐบาลได้รณรงค์ให้มีการวางแผนครอบครัว ให้มีบุตรไม่เกิน 2-3 คน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงต้องทำการเก็บซีรั่มจากสตรีที่ตั้งครรภ์ทุกรายโดยไม่คำนึงถึงจำนวนครั้งของการตั้งครรภ์ เพื่อที่จะได้มีโอกาสตรวจพบแอนติบอดีย์มากขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถพบแอนติบอดีย์ที่มีคุณภาพดีพอที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

2. จากการตรวจหาแอนติบอดีย์ในซีรั่มของสตรีไทยที่ตั้งครรภ์จำนวน 2,000 ราย พบซีรั่มที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์แล้วให้ผลบวกเท่ากับหรือมากกว่า 20% ขึ้นไป จำนวน 254 sera คิดเป็นร้อยละ 12.7 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่มีผู้เคยรายงานไว้ เช่น ปรียาจิต เจริญวงศ์ และคณะ[16] รายงานไว้ว่าพบร้อยละ 14.4 ในคนไทย และ Payne[17] รายงานว่าพบร้อยละ 17 ผลการวิจัยครั้งนี้เมื่อจำแนกตามความจำเพาะต่อแอนติเจน จะแยกได้เป็น 3 ประเภท คือ

2.1 Monospecific sera ซึ่งจัดเป็นกลุ่มแอนติบอดีย์ที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด ตรวจพบ 79 sera คิดเป็นร้อยละ 3.95 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ พิมล เชี่ยวศิลป์ และคณะ[18] ซึ่งพบร้อยละ 4.38 นอกจากนี้แล้วยังพบว่าแอนติบอดีย์ของโลคัส A พบได้บ่อยกว่าแอนติบอดีย์ของโลคัส B[11] ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับรายงานของ ปรียาจิต เจริญวงศ์ และคณะที่รายงานไว้ในปี 2523[16] แต่ในงานวิจัยครั้งนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีย์ของโลคัส B เพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด คือ Anti - B 15 และ Anti - BW. 46

2.2 Multispesific sera คือแอนติบอดีย์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป ซึ่งส่วนใหญ่จะให้ weak reaction จึงไม่มีประโยชน์ที่จะนำไปใช้ได้

2.3 Unidentified sera คือกลุ่มของซีรั่มที่ให้ผลบวก แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นแอนติบอดีย์ชนิดใด ทั้งนี้เพราะ panel cell ยังมี "blank" หรือ "unknown antigen" อยู่มาก ซึ่งยังไม่อาจหา Typing sera มาตรวจหาได้ ได้แก่ แอนติเจนในกลุ่ม HLA - Aw 19 complex ซึ่งในคน oriental จะพบว่าเป็น HLA-A 31 และ Aw 33 และแอนติเจน HLA-B 35, Bw 22 และ B 16 ในโลคัส B ด้วย ดังนั้นจึงยังคงเก็บซีรั่มเหล่านี้ไว้เพื่อทำการศึกษาใหม่อีกครั้ง เมื่อสามารถหา Typing sera มาทำการตรวจสอบกับ panel cell กลุ่มที่ยังคงเป็น "blank" อยู่ในแต่ละโลคัส และรวบรวมผลได้ครบสมบูรณ์แล้ว

3. จาก Monospecific sera 79 sera (3.95%) สามารถคัดเป็น Typing sera ได้โดยเลือกซีรั่มที่มีค่า R มากกว่า 0.70 และมี % strong reaction มากกว่า 80 ซึ่งคัดได้ Typing sera ทั้งหมด 12 ชนิด จำนวน 57 sera คิดเป็นร้อยละ 2.85 แยกเป็นแอนติบอดีย์สำหรับโลคัส A 4 ชนิด พบมากที่สุด คือ Anti - A2 ส่วนโลคัส B พบถึง 8 ชนิด พบมากที่สุดคือ Anti - B5 และ Anti - B13 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการตรวจพบ Typing sera ในงานวิจัยนี้ คือ

ก. สามารถที่จะลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อแอนติบอดีย์จากต่างประเทศ ซึ่งนอกจากจะมีราคาแพงแล้ว แอนติบอดีย์บางชนิดยังไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจในคนไทยอีกด้วย

ข. พบแอนติบอดีย์บางชนิดที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษา HLA typing ของคนไทยและเป็นแอนติบอดีย์ที่หายาก แต่ไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด เช่น HLA - Bw 46 เป็นต้น

ค. Typing sera ของคนไทยนี้สามารถนำไปแลกเปลี่ยน (exchange sera program) กับห้องปฏิบัติการ

Tissue Typing ต่าง ๆ ทั่วโลก อันจะทำให้มีโอกาสได้แอนติบอดีย์ที่หายาก หรือไม่อาจหาซื้อได้มาใช้ ทั้งยังเป็นการเผยแพร่ผลงานของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้เป็นที่ยอมรับของนานาประเทศอีกด้วย

ง. สามารถที่จะนำ Typing sera เหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบ HLA โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคต่าง ๆ กับระบบ HLA ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย

สรุป

จากการตรวจแอนติบอดีย์ของระบบ HLA จากสตรีไทยที่ตั้งครรภ์ 2,000 ราย ได้พบว่าอัตราการตรวจพบแอนติบอดีย์จะสูงขึ้นตามจำนวนครั้งของการตั้งครรภ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) ด้วยวิธีทาง Microlymphocytotoxicity - NIH technic พบแอนติบอดีย์ของระบบ HLA คิดเป็นร้อยละ 12.7 และสามารถคัด Typing sera ได้คิดเป็นร้อยละ 2.85 Typing sera พบมี 12 ชนิด ที่พบมากที่สุดคือ Anti - A 2, Anti - B 5 และ Anti - B 13 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

เพื่อเป็นการพัฒนางานของห้องปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการ Tissue Typing ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้มีระดับความสามารถในการทำงานทัดเทียมกับมาตรฐานต่างประเทศ นั่นคือสามารถจะทำการตรวจและศึกษา HLA-DR ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่องานวิจัยค้นคว้าทางการแพทย์อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน อาทิเช่น มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการปลูกถ่ายอวัยวะ การทดสอบความเป็นพ่อลูก การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระบบ HLA และโรคต่าง ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบพันธุ์กรรม เป็นต้น จึงเห็นสมควรที่จะทำการตรวจหาแอนติบอดีย์ของระบบ HLA Class ที่ 2 (HLA-DR, DQ) ในสตรีไทยที่ตั้งครรภ์ ในระยะเวลาอันใกล้นี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Kissmeyer Nielsen ผู้อำนวยการศูนย์ Scandiatransplant มหาวิทยาลัย Arhus ประเทศเดนมาร์คที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือตรวจ HLA Typing ให้กับกลุ่ม panel ศจ.นพ. วิศิษฏ์ สิตปรีชา ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะและสนับสนุนงานมาโดยตลอด รศ. นพ. ประพันธ์ ภานุภาค ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยแก้ไขอุปสรรคต่าง ๆ ให้ลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องฝากครรภ์ที่ได้ช่วยเหลือในการเจาะเก็บเลือดสตรีที่มาฝากครรภ์ พร้อมซักถามประวัติได้อย่างถี่ถ้วน ทำให้ได้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

สุดท้ายขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนให้ทุนรัชดาภิเษกสมโภชในการทำวิจัยครั้งนี้

อ้างอิง

1. Dewolf WC, Dupont B, Yunis EJ. HLA and disease : current concepts. Human Pathology 1980 Jul ; 11 (4) : 332-337
2. Svejgaard A, Ryder LP. Associations between HLA and disease. In : Dausset LJ, Svejgard A, eds. HLA and Disease. Copenhagen : Munksgaard, 1977. 46-53
3. Klein J. Evolution and function of the major histocompatibility system facts and speculations. In : Di Gotze, eds. The Major Histocompatibility System in Man and Animals. Berlin : Springer-Verlag, 1977. 339
4. Bodmer WF. The HLA system 1984. In : Albert ED, eds. Histocompatibility Testing 1984 and HLA Nomenclature Committee Report 1984. Berlin : Springer-Verlag, 1984. 4-22
5. Baur MP, Danilovs JA. Population Analysis of HLA-A,B,C, DR and other genetic markers. In : Terasaki PI, eds. Histocompatibility Testing 1980. UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angles : UCLA, 1980. 955-993
6. van Rood JJ, van Leeuwen, Eemiss JG. Leukocyte antibodies in the sera of pregnant women. Vox Sang 1959 ; 4 : 427-444
7. Payne R. The development and persistence of leukoagglutinins in parous women. Blood 1962 Apr ; 19 (4) : 411-424
8. Jenson KG. Leukocyte antibodies in serums of pregnant women, serology and clinic. Vox Sang 1962 Jul-Aug; 7 : 454-469
9. Boyum A. Seperation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 1968 ; 21 Supp 97 : 77-89
10. Terasaki PI, Park MS. NIAID manual of tissue typing technique 1976-1977. In :

Ray. eds. Government Printing Office, DHEW Publication No. (NIH) 76-545, 1976. 69-78

11. Staub-Nielsen L, Svejgaard A. HLA immunization and HLA types in pregnancy. Tissue Antigens 1972 ; 2 : 316-327
12. Race. Methods used in blood grouping, and identification of blood group antibodies. In : Race RR. Sanger R, eds. Blood Group In Man. 6 ed. Oxford. Blackwell Scientific Publication. 1954. 16-17
13. Terasaki PI, Mickey MR, Yamazaki JN. Maternal-fetal incompatibility : incidence of HLA antibodies and possible association with congenital anomalies. Transplantation 1970 Nov-Dec; 9 (6) : 538-543
14. Ahrons S. Leukocyte antibodies-occurence in primigravida. Tissue Antigens 1971 ; 1 : 178-183
15. Vives J, Gelabert A, Castillo R. HLA antibodies and period of gestation decline in frequency of positive sera during last trimester. Tissue Antigens 1976 : 7 : 209-212
16. Charoenwongse P, Bhutharamongkol N, Pongsathaporn S., Srisuvanavilai LO, Chandanayingyong D. The HLA antibodies in Thai pregnant women at Siriraj Hospital. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1979 Jun; 10 (2) : 207-208
17. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal leukocyte incompatibilities. J Clin Invest 1958 Dec; 37 (12) : 1756-1763
18. Chiewsilp P, Chanarat P, Limtrakan J. The occurrence of lymphocytotoxins in pregnant women. J Med Assoc Thai 1979 Feb; 62 (2) : 59-63