การพัฒนาวิธีการตรวจจีโนไทป์ของ Human platelet antigen-12w และ 16w (HPA-12w และ HPA-16w) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction- Sequence Specific Primer (PCR-SSP)

The Development of HPA-12w and HPA-16w Genotyping Method Using PCR-SSP Technique

มยุรี เก่งเกตุ[1]*, วีรวรณ ชาญศิลป์[1], สมหญิง งามอุรุเลิศ[1], กาญจนา ศิริรัตน์[1],
พิรญาณ์ นาคศิริ[1], ญาณิศา ชานนตรี[1], ภาวิณี คุปตวินทุ[2], อรรถพล ศรีสุดดี[2]
[1]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
[2]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
*E-mail: mayuree.ke@gmail.com

บทคัดย่อ

Human platelet antigen (HPA) ปัจจุบันมีทั้งหมด 29 ระบบ HPA-12w และ HPA-16w เป็นระบบที่พบว่ามีความสำคัญทางคลินิกทำให้เกิดภาวะ fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) การศึกษาความถี่ของยีนระบบนี้ในประชากรไทยมีจำนวนน้อยมาก งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจโดยทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่จำเพาะกับอัลลีลระบบ HPA-12w และ HPA-16w ในหลอดทดลอง โดยทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจหาจีโนไทป์ของ ระบบ HPA-12w และ HPA-16w ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-12b และ HPA-16b control ที่สังเคราะห์ขึ้น และตรวจหาจีโนไทป์ของระบบ HPA-12w และ HPA-16w ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคของศูนย์บริการโลหิต 100 ตัวอย่าง จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาจีโนไทป์ทั้ง 2 ระบบ พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ HPA-12w และ HPA-16w คือ 9.6 µM ของ Human Growth Hormone (HGH) คือ 6.4 µM อุณหภูมิช่วง annealing ที่เหมาะสมคือ 64 °C เมื่อตรวจจีโนไทป์ของ 2 ระบบในตัวอย่างดีเอนเอ 100 ตัวอย่างพบว่าเป็น HPA-12a12a และ HPA-16a16a ทั้ง 100 ตัวอย่าง (100%) และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-12b และ HPA-16b control คือ 6.11×10^{-8}ng และ 1.25×10^{-4}ng การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าวิธี PCR-SSP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจจีโนไทป์ของ HPA-12w และ HPA-16w เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจถูกต้องแม่นยำ ง่าย สะดวก และราคาถูก สามารถนำมาใช้ในงานประจำ และตรวจหาความถี่ของอัลลีลนี้ในประชากรไทยได้

คำสำคัญ: HPA-12w HPA-16w การตรวจจีโนไทป์

Abstract

Currently, 29 HPA systems have been officially nominated. HPA-12w and HPA-16w are important antigenic systems involving platelet alloimmunity, such as fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT). The studies of these systems in Thai population had few reports. In this study, PCR condition optimization was developed in order to increase numbers of HPA-12w and HPA-16w. Determined a suitable condition for HPA-12w and HPA-16w genotyping method using Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP), determined an optimal concentration of HPA-12b and HPA-16b control, and detected these genotypes in 100 Thai blood donors. A suitable PCR condition was established. The concentrations of HPA-12 and HPA-16 primers were 9.6 µM and for Human Growth Hormone (HGH) were 6.4 µM. The optimal temperature for annealing was 64°C. At this concentration and temperature, HPA-12a12a and HPA-16a16a were found 100% . The optimal concentration for HPA-12b and HPA-16b control

were 6.11×10^{-8}ng และ 1.25×10^{-4}ng, respectively. This study indicated that PCR-SSP was a simple, inexpensive and accurate genotyping method for HPA-12w and HPA-16w genotyping. This protocol can be applied for routine laboratory and can be used for studying these alleles in Thai population.

Keywords: Human platelet antigen, HPA-12w, HPA-16w, Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP)

บทนำ

เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือด การให้เกล็ดเลือดจึงมีความจำเป็นกับผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ หรือมีเลือดออก ตามเกณฑ์มาตรฐานการให้เกล็ดเลือดสามารถให้ตามหมู่ ABO ได้โดยไม่ต้องทดสอบความเข้ากันได้ของเกล็ดเลือด แต่เนื่องจากบนผิวของเกล็ดเลือดมีแอนติเจนหลายชนิด ได้แก่ แอนติเจนหมู่ ABO แอนติเจนต่อเม็ดเลือดขาว (Human leukocyte antigen: HLA) และแอนติเจนต่อเกล็ดเลือด (Human platelet antigen: HPA) หากผู้ป่วยได้รับเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนแตกต่างจากของตัวเอง อาจสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ไม่ตรงกันระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดบ่อยครั้งจะมีโอกาสสร้างแอนติบอดีได้มากขึ้น ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่สำคัญคือ ภาวะ fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia หรือ FNAIT เป็นภาวะเกล็ดเลือดต่ำของทารกในครรภ์หรือแรกคลอด เนื่องจากมี HPA ไม่ตรงกันกับมารดาส่งผลให้มารดาสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้น เกิดการทำลายเกล็ดเลือดของทารก (1), post-transfusion purpura หรือ PTP ภาวะที่มีจ้ำเลือดหลังการ รับเลือด มีสาเหตุจากผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไปเกิดการทำลายเกล็ดเลือด รวมถึงสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดตนเอง ทำให้ผู้ป่วยมีเกล็ดเลือดลดต่ำมาก และมีอาการเลือดออกอย่างรุนแรงได้ (1), platelet transfusion refractoriness หรือ PTR ภาวะที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด เมื่อให้เกล็ดเลือดไปแล้วปริมาณเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นตามที่ควรจะเป็น เนื่องจากเกล็ดเลือดที่ให้นั้นถูกทำลายโดยแอนบอดีของผู้ป่วย (1,2) ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องคัดเลือกเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนที่ตรงกันให้แก่ผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีนั้น ในปัจจุบันแอนติเจนของเกล็ดเลือดมีทั้งหมด 29 ระบบ คือ HPA-1 ถึง HPA-29w (3) ส่วนใหญ่แต่ละระบบมีอัลลีล 2 แบบ ได้แก่ a และ b ซึ่งเกิดจากมีลำดับเบสต่างกัน 1 เบส หรือจากการขาดหายไปของเบส ระบบที่มีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ ระบบ HPA-1 ถึง HPA-6 และ HPA-15 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการสร้างแอนติบอดีบ่อยครั้งในหลายเชื้อชาติ (4) จากการศึกษาของ Sachs U. และคณะ และ Curtis BR. and McFarland JG. พบว่า HPA-12w และ HPA-16w มีความสำคัญทางคลินิกคือทำให้เกิดภาวะ FNAIT (4,5) ในเอเชียมีผู้ศึกษาระบบนี้ได้แก่ Nie Y-M. และคณะ ได้ระบุว่าพบจีโนไทป์ HPA-12a/a และ HPA-16a/a 100% ไม่พบจีโนไทป์ HPA-12a/b, HPA-12b/b, HPA-16a/b และ HPA-16b/b ในชาวจีนกวางตุ้ง (6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng ML. และคณะ ได้ระบุว่า พบยีน HPA-12a/a และ HPA-16a/a 100% ในชาวจีนฮั่นเช่นกัน (7) อุบัติการณ์การเกิดปัญหาทางคลินิกจากแอนติบอดีสองระบบในแถบเอเชียยังไม่มีรายงาน รวมถึงในประเทศไทย ซึ่งอาจมีข้อจำกัดในการตรวจหาชนิดแอนติบอดี รวมถึงยังไม่มีรายงานความถี่ของ HPA-16w ในประเทศไทยเลย และ ในขณะที่ HPA-12w ก็มีการศึกษาจำนวนน้อยมาก (8) จึงยังไม่สามารถคาดเดาได้ว่าจะเป็นระบบที่มีความสำคัญทางคลินิกต่อคนไทยหรือไม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา HPA ทั้ง 2 ระบบ นี้ โดยการพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) สำหรับตรวจหาชนิดและความถี่ของ HPA-12w และ HPA-16w เพื่อให้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้อง สามารถนำไปใช้ศึกษาหาความถี่ของอัลลีล และประยุกต์ใช้ในงานประจำคัดเลือกหาผู้บริจาคเกล็ดเลือดที่เหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีน HPA-12w และ HPA-16w โดยวิธี PCR-SSP

2. เพื่อศึกษานำร่องตรวจหายีน HPA-12w และ HPA-16w ในดีเอนเอผู้บริจาคโลหิตชาวไทย 100 ตัวอย่าง

ขอบเขตการทำวิจัย

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่จำเพาะกับตำแหน่ง HPA-12w และ HPA-16w ในหลอดทดลอง และตรวจหาจีโนไทป์ของยีน *HPA-12* และ *HPA-16* โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมและทดลองตรวจหา HPA-12w และ HPA-16w และดีเอ็นเอของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย

ทบทวนวรรณกรรม

1. แอนติเจนของเกล็ดเลือด Human platelet antigen (HPA) (1)

แอนติเจนที่ปรากฏอยู่บนผิวของเกล็ดเลือดแบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่ 1) แอนติเจนที่ไม่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (platelet non-specific alloantigens) เป็นแอนติเจนที่สามารถพบร่วมกันกับเซลล์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากเกล็ดเลือด เช่น แอนติเจนของเม็ดเลือดแดงได้แก่ แอนติเจน ABO, Lewis และแอนติเจนบนเม็ดเลือดขาวได้แก่ HLA class I 2) แอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (platelet specific alloantigens) แอนติเจนในกลุ่มนี้พบเฉพาะบนผิวของเกล็ดเลือด (HPA) อยู่บนไกลโคโปรตีน (glycoprotein:GP) ได้แก่ GPIa, GPIbα, GPIbβ, GPIIb GPIIIa และ CD109 ในปัจจุบันแอนติเจนของเกล็ดเลือดนั้นมีทั้งหมด 29 ระบบ คือ HPA-1 ถึง HPA-29w (3) ในแต่ละระบบมีอัลลีล 2 ชนิด ได้แก่ a และ b ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากมีลำดับเบสต่างกัน 1 เบส โดยการกำหนดให้อัลลีล a เป็นแอนติเจนที่พบได้บ่อยกว่าอัลลีล b (ตารางที่ 1)

2 การเรียกชื่อของแอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (The nomenclature of platelet specific alloantigen) (9)

การตั้งชื่อระบบ HPA โดยคณะกรรมการของ International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) และ The International Society of Blood Transfusion (ISBT) ซึ่งเริ่มก่อตั้งในปี 1990 ทำหน้าที่กำหนดกฎของการเรียกชื่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดขึ้นมา ดังนี้ 1) กำหนดให้เรียกแอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือดว่า “Human Platelet Alloantigen (HPA)” 2) ระบบของแอนติเจนต่างๆ กัน จะถูกกำหนดโดยใช้ตัวเลขเรียงตามลำดับของวันที่นำเสนอ เช่น HPA-1 HPA-2 3) อัลลีลของแอนติเจนระบบต่างๆ กันจะใช้ตัวอักษร a และ b เป็นตัวกำหนดโดยให้ a เป็นอัลลีลที่มีความถี่การตรวจพบมาก ส่วน b อัลลีลที่ตรวจพบน้อย 4) แอนติเจนที่ผ่านการยอมรับให้เป็นระบบใหม่ ต้องผ่านการพิจารณาของกรรมการ ICSH/ISBT ก่อน ปัจจุบันนำวิธีการตรวจทางโมเลกุลวิทยาทำให้มีการค้นพบแอนติเจนในระบบใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการกำหนดแอนติเจนที่พึ่งค้นพบใหม่ให้กำหนดตัวอักษร “W” ไว้ก่อน จนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าเป็นแอนติเจนชนิดใหม่ตามคุณสมบัติการกระตุ้นแอนติบอดี และไม่ใช่แอนติเจนที่พบเฉพาะในชนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น (private antigen) จึงกำหนดระบบของแอนติเจนของเกล็ดเลือด “HPA” ซึ่งปัจจุบันจึงมีการจัดแบ่งแอนติเจนของเกล็ดเลือดออกเป็น 29 ระบบ (3) โดยส่วนใหญ่อัลลีล a และ b นั้นมีลำดับของเบสที่แตกต่างกันเพียง 1 เบส ทำให้สามารถใช้ในการแยกความจำเพาะของอัลลีลของแต่ละระบบได้

3. ภาวะทางคลินิกที่มีสาเหตุมาจากแอนติบอดีของเกล็ดเลือด(Clinical condition caused by immunization of HPA)

HPA ที่มีความสำคัญทางคลินิกในเกือบทุกเชื้อชาติ มีอยู่ 7 ระบบคือ HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4,

HPA-5, HPA-6 และ HPA-15 (4,10) ส่วนระบบอื่นๆ จะก่อปัญหาทางคลินิกไม่บ่อยเท่า 7 ระบบนี้ ภาวะทางคลินิกมีสาเหตุมาจากแอนติบอดีของเกล็ดเลือดของผู้ป่วย ทำลายเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไป และ/หรือ ภาวะที่เกล็ดเลือดในร่างกายถูกทำลายเนื่องจากมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเกล็ดเลือดผู้ป่วย (2) แบ่งออกเป็น 3 ภาวะได้แก่

3.1 ภาวะ Fetal-Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT) (11-12) เป็นภาวะที่เกล็ดเลือดของทารกในครรภ์หรือแรกคลอดถูกทำลายโดยแอนติบอดีของมารดา ทำให้เกล็ดเลือดของทารกลดต่ำลง มีสาเหตุจากการที่เกล็ดเลือดของทารกในครรภ์มีแอนติเจน HPA แตกต่างกับมารดา เช่นเด็กมีแอนติเจน HPA-1a แต่มารดาไม่มีแอนติเจน HPA-1a เมื่อมีเลือดทารกผ่านเข้าสู่กระแสเลือดของมารดาทางรก จึงกระตุ้นมารดาให้สร้าง anti-HPA-1a ได้ และทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือดของทารก ทำให้เกล็ดเลือดของทารกถูกทำลาย อาการทางคลินิกของโรคพบตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงตั้งแต่อยู่ในครรภ์ขณะคลอดหรือหลังคลอด อาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที

3.2 ภาวะมีจ้ำเลือดภายหลังการรับเกล็ดเลือด (Post-transfusion purpura: PTP) (11, 13) เป็นภาวะเกิดเมื่อผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ เมื่อได้รับเกล็ดเลือดแล้วเกล็ดเลือดนั้นถูกทำลาย ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะ thrombocytopenia อยู่ประมาณ 1 สัปดาห์ ภาวะนี้เกิดจากเกล็ดเลือดที่ให้มี HPA ต่างจากผู้รับ จึงสร้างแอนติบอดีมาทำลายเกล็ดเลือดนั้น ผู้ป่วยจะมีอาการมีจ้ำเลือดเกิดเอง และบางรายเลือดไหลไม่หยุด เนื่องจากผู้ป่วยมีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำ

3.3 ภาวะการไม่ตอบสนองต่อเกล็ดเลือดที่ให้ (Platelet transfusion refractoriness: PTR) (11, 14) พบในผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่ต้องได้รับเกล็ดเลือดบ่อยๆ และผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเกล็ดเลือด แอนติบอดีที่พบเป็นปัญหาได้บ่อย ได้แก่แอนติบอดีต่อ HLA, HPA และ HNA อาการของภาวะนี้คือเมื่อได้รับเกล็ดเลือดในปริมาณมาก แต่ปริมาณเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นตามหลักการให้เกล็ดเลือด เนื่องจากเกล็ดเลือดที่ให้ถูกทำลายโดยแอนติบอดีของผู้ป่วย การพิจารณาภาวะ PTR ทำโดยการคำนวณจากค่าของเกล็ดเลือดที่คาดว่าจะเพิ่มขึ้นเรียกว่า ค่า corrected platelet count increment (CCI) และ percent of predicted platelet count increment (%PPCI)

4. HPA gene frequencies ของชนชาติต่างๆ

ความถี่ของอัลลีลของยีน HPA แต่ละระบบมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ (15) (ตารางที่ 2) การก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิกจึงขึ้นอยู่กับความถี่ของอัลลีลในชนชาตินั้นๆ จากการศึกษาของ Kupatawintu P.และคณะ พบว่า anti-HPA-2b, -3a และ -5b พบบ่อยในผู้ป่วยเกล็ดเลือดต่ำชาวไทย (16) ซึ่งสอดคล้องกับความถี่ที่พบแอนติเจน HPA-2b, -3a และ -5b ที่ค่อนข้างสูง (17-18) ในขณะที่ anti HPA-1a เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ FNAIT และ PTP ได้บ่อยที่สุดในประชากรผิวขาว (Caucasian) แต่มีรายงานความถี่ของ anti-HPA-1a น้อยในคนไทย ประกอบกับพบแอนติเจน HPA-1a ได้ในอัตราที่สูงมาก จึงมีโอกาสน้อยที่จะเป็นสาเหตุของ FNAIT และ PTP ในชาวไทย รวมถึงแอนติเจน HPA-1a, -4a, -4b, -5a และ HPA-6a ที่พบได้สูง จึงมีโอกาสน้อยที่จะเป็นสาเหตุของ FNAIT, PTP และ PTR ได้น้อยเช่นกัน สำหรับแอนติเจน HPA-2b พบในอัตราที่ต่ำกว่าในชาวเกาหลีและชาวญี่ปุ่น จึงมีโอกาสสร้าง anti-HPA-2b ในสองชนชาตินี้สูงกว่าชนชาวเอเชียชาติอื่น ส่วน anti HPA-4b พบว่ามีปัญหาทางคลินิกได้บ่อยในคนญี่ปุ่น (19)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของ (HPA) แต่ละระบบ (3)

Antigen	Glyco-protein	HGNC	Chromosme	Ref_Seq	Uni-Prot	dbSNP	Nucleotide Change	Mature Protein
HPA-1	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	rs5918	176T>C	L33P
HPA-2	GPIba	*GP1BA*	17	NM_000173	GPBA_Human	rs6065	482C>T	T145M
HPA-3	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human	rs5911	2621T>G	I843S
HPA-4	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	rs5917	506G>A	R143Q
HPA-5	GPIa	*ITGA2*	5	NM_002203	ITGA2_Human	rs10471371	1600G>A	E505K
HPA-6w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	rs13306487	1544G>A	R489Q
HPA-7w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		1297C>G	P407A
HPA-8w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		1984C>T	R636C
HPA-9w	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human		2602G>A	V837M
HPA-10w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		263G>A	R62Q
HPA-11w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		1976G>A	R633H
HPA-12w	GPIbb	*GP1BB*	22	NM_000407	GPBB_Human		119G>A	G15E
HPA-13w	GPIa	*ITGA2*	5	NM_002203	ITGA2_Human		2483C>T	T799M
HPA-14w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		1909_1911delAAG	K611del
HPA-15	CD109	*CD109*	6	NM_133493	Q8TDJ3	rs10455097	2108C>A	S682Y
HPA-16w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		497C>T	T140I
HPA-17w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		662C>T	T195M
HPA-18w	GP1a	*ITGA2*	5	NM_002203	ITGA2_Human		2235G>T	Q716H
HPA-19w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	ss120032848	487A>C	K137Q
HPA-20w	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human	ss120032852	1949C>T	T619M
HPA-21w	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	ss120032849	1960G>A	E628K
HPA-22bw	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human	rs142811900	584A>C	K164T
HPA-23bw	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	rs139166528	1942C>T	R622W
HPA-24bw	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human		1508G>A	S472N
HPA-25bw	GPIa	*ITGA2*	5	NM_002203	ITGA2_Human		3347C>T	T1087M
HPA-26bw	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human		1818G>T	K580N
HPA-27bw	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human	rs149468422	2614C>A	L841M
HPA-28bw	GPIIb	*ITGA2B*	17	NM_000419	ITAB_Human	ss550827881	2311G>T	V740L
HPA-29bw	GPIIIa	*ITGB3*	17	NM_000212	ITB3_Human	ss1221285311	98C>T	T7M

ตารางที่ 2 The HPA gene frequencies in different populations (15)

	Chinese		Japanese		Korean		Indonesian		Malaysian		Thai		African		German		British		Australian	
system	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

5. HPA-12w (Iy) (5)

แอนติเจนของระบบนี้จะอยู่บน GPIb/IX complex ซึ่ง GPIb ประกอบด้วยสาย beta (GPIb-beta) ซึ่งเชื่อมกับสาย alpha (GPIb-alpha) ด้วยพันธะ disulphide HPA-12w จะอยู่บนไกลโคโปรตีนชนิด GPIb-beta ถูกถอดรหัสจากยีน *GPIBB* ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 22 เกิดจากการแทนที่ของเบสในลำดับที่ 119 จาก guanine (G) เป็น adenine (A) ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 15 เปลี่ยนจาก glycine เป็น glutamic acid เดิมเรียกแอนติเจนระบบ HPA-12w ว่า ***Iy***^{a} ถูกค้นพบจากผู้ป่วยภาวะ FNAIT เนื่องจากทารกมีแอนติเจน HPA-12a (***Iy***^{a}) แต่มารดาไม่มีแอนติเจน HPA-12a เมื่อเลือดทารกเข้าสู่กระแสเลือดของมารดา จึงกระตุ้นมารดาให้สร้าง anti-HPA-12a ขึ้นได้ ซึ่งทำให้ทารกเกิดภาวะ FNAIT (3-5)

6. HPA-16w (Duv^{a}) (19)

แอนติเจนระบบนี้จะอยู่บนไกลโคโปรตีนชนิด GPIIIa สร้างจากยีน *ITGB3* อยู่บนโครโมโซมที่ 17 เมื่อมีการแทนที่ของเบสในลำดับที่ 517 จาก cytosine (C) เป็น thymine (T) ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 140 เปลี่ยนจาก threonine เป็น isoleucine เดิมเรียกระบบ HPA-16w นี้ว่า Duv^{a} ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกคือทำให้เกิดภาวะ FNAIT ค้นพบจากการที่ลูกที่มีภาวะ FNAIT เนื่องจากมี HPA-16a16a ส่วนแม่ไม่มี HPA-16a จึงสร้าง anti-16a มาทำลายเกล็ดเลือดของลูก ซึ่งพิสูจน์ได้จากการหาตำแหน่งของยีน HPA ที่ผิดปกติใน GPIIIa ของแม่และลูกที่มีภาวะ FNAIT จนพบตำแหน่งที่สนใจแล้วนำยีนในตำแหน่งนั้นไปสังเคราะห์เป็นยีน 2 ชนิดคือ Wild type และ mutation type โดยวิธี cell culture และนำยีนทั้งสองแบบเข้าไปใน cell ทดสอบ เพื่อให้ผลิตแอนติเจนแต่ละแบบใน cell

7. วิธีใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือด (Methods for platelet alloantigen determination)

การตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียในการตรวจที่แตกต่างกันออกไป การคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ ในอดีตการตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือดทำด้วยวิธีซีโรโลยี แต่พบว่ามีข้อจำกัดมากเนื่องจากขาดแคลนแอนติบอดีชนิดต่างๆ และเกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่ใช้ตรวจมักมีปริมาณน้อยจากภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ดังนั้นวิธีที่นิยมตรวจในปัจจุบันจึงเป็นวิธีทางโมเลกุล เป็นการตรวจหาอัลลีลของยีนที่สร้างแอนติเจนบนเกล็ดเลือดซึ่งมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดในการตรวจที่แตกต่างกันออกไป วิธีการตรวจใช้วิธีทางโมเลกุลวิทยา (Molecular method) ที่นิยมตรวจได้แก่ polymerase chain reaction with restriction 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) (1) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมตรวจหาอัลลีลมากที่สุด เพราะมีความสะดวก ง่าย ราคาประหยัด

ระเบียบวิธีวิจัย

1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้

1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม HPA-12a และ HPA-16a

1.2 ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมแบบสังเคราะห์ HPA-12b และ HPA-16b (gBlocks Gene Fragment)

1.3 ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย จำนวน 100 ตัวอย่าง

2 วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมไพรเมอร์

1) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอัลลีลของยีน HPA (HPA primer) แต่ละระบบ ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 เส้น ได้แก่ HPA-12a(HPA-16a), HPA-12b(HPA16b), HPA-12 common(HPA-16 common) (ตารางที่ 3)

2) ไพรเมอร์ควบคุมระบบ (internal control primer) คือ Human growth hormone (HGH) พบได้ทุกคน ใช้เป็นตัวควบคุมระบบการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (ตาราง 3)

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์จำเพาะสำหรับการตรวจหายีน *HPA-12* และ *HPA-16*

Gene	Primer Name	Sequences (5'-3')	Length (bp)	Product
HPA-12	H-12a primer	GAC GCT CGT GGA CTG CGG	18	307 bp
	H-12b primer	GAC GCT CGT GGA CTG CGA	18	
	H-12 common	CTC GTC CTC GGC CAG ATA	18	
HPA-16	H-16a primer	GTG AGC TTT CGC ATC TGG G	19	267 bp
	H-16b primer	GGT GAG CTT TCG CAT CTG GA	20	
	H-16 common	GGCTTTCTGGTTTGCTTTGA	20	
HGH	HGH-F	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA	21	1,024 bp
	HGH-R	GTC CAT GTC CTT CCT GAA GCA	21	

3. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีPCR สำหรับตรวจหาอัลลีล HPA-12w และ HPA-16w

หาโปรแกรม PCR ที่เหมาะสมในการตรวจจีโนไทป์ของ HPA-12w และ HPA-16w โดยการใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ 6.4 µM แล้วปรับอุณหภูมิในช่วง annealing ของปฏิกิริยา PCR ตั้งแต่ 67°C และลดลงถึง 64°C โดยอุณหภูมิช่วงอื่นๆ คงที่ คือ denature ที่อุณหภูมิ 96°C นาน 5 นาที 1 รอบ ทำปฏิกิริยาที่ 96°C นาน 30 วินาที 67°C (ปรับจาก 67°C ถึง 64°C) นาน 45 วินาที 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ โดยปรับความเข้มข้นของ primer ทั้ง 2 คู่ เพื่อให้ได้ band ของ PCR ที่สวยงามเหมาะสม โดยเริ่มปรับจากความเข้มข้น 6.4 µM เท่ากัน จากนั้นปรับเพิ่มหรือลดความเข้มข้นตามความชัดเจนของ band ที่ได้

4. การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-12b/b และ HPA-16b/b แบบสังเคราะห์

ปรับความเข้นข้นเริ่มต้นของ HPA-12b และ HPA-16b (gBlocks Gene Fragment) ตั้งแต่ 1 $x10^{-3}$ ng แล้วเจือจางลงไปเรื่อยๆ แบบ two fold dilution จนสามารถให้ผลที่ชัดเจน และถูกต้องหลังจากขั้นตอนการทำ PCR

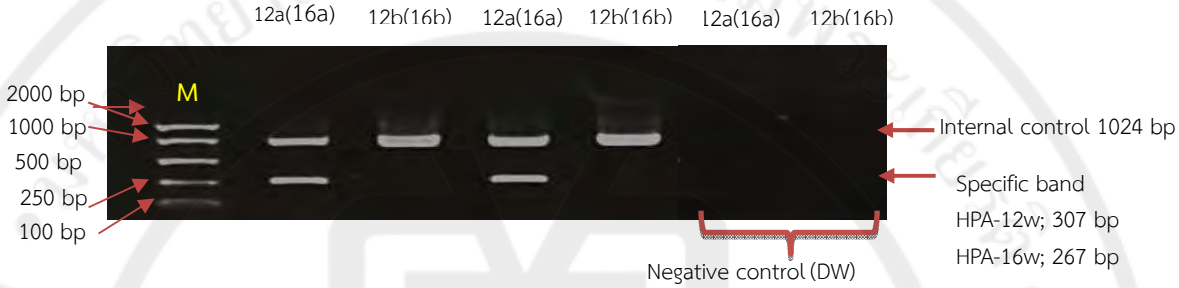
5. การทดสอบหาจีโนไทป์ของยีน *HPA-12w* และ *HPA-16w*

ตรวจหา HPA-12w และ HPA-16w genotyping ด้วยเทคนิค PCR-SSP ในตัวอย่างดีเอ็นเอผู้บริจาคเกล็ดเลือดจำนวน 100 ตัวอย่าง โดยการเตรียมส่วนประกอบของ PCR master mix ดังนี้

HPA-12w genotyping มีส่วนผสมในแต่ละปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาตรทั้งหมด 10 µl ประกอบด้วย Gotaq® Green Master Mix (Promega/USA) 5 µl, ไพรเมอร์ 2 µl (HPA-12a/HPA-12b, HPA-12 common เข้มข้น 9.6 µM, HGH-F และ HGH-R เข้มข้น 6.4 µM อย่างละ 0.5 µl), DW 2 µl และ DNA 1 µl

HPA-16w genotyping มีส่วนผสมในแต่ละปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาตรทั้งหมด 10 µl ประกอบด้วย Gotaq® Green Master Mix (Promega/USA) 5 µl, ไพรเมอร์ 2 µl (HPA-16a/HPA-16b ,HPA-16 common เข้มข้น 9.6 µM, HGH-F และ HGH-R เข้มข้น 6.4 µM อย่างละ 0.5 µl), DW 2 µl และ DNA 1 µl

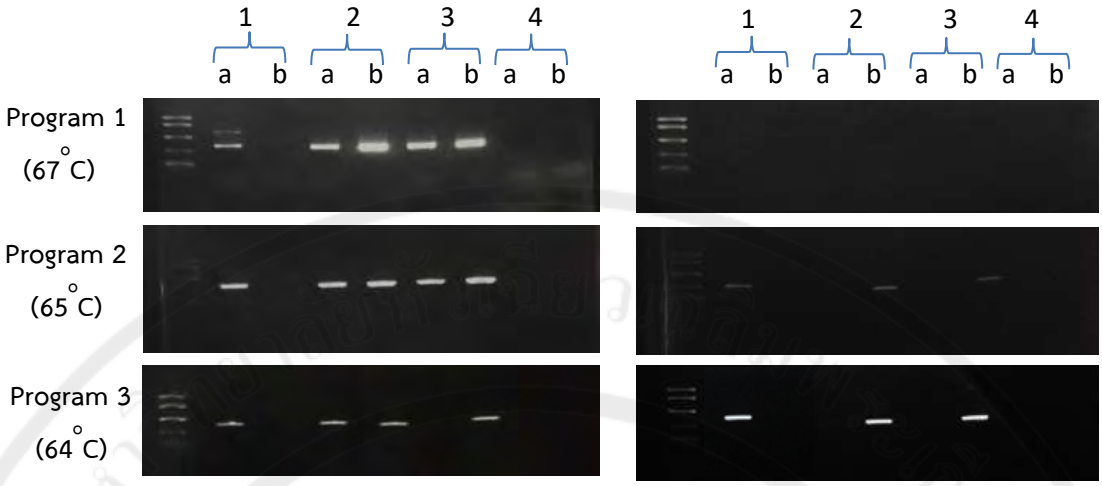
จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Boeco, Germany) โดยมี PCR program คือ 96°C นาน 5 นาที 1 รอบ 96°C นาน 30 วินาที 64°C นาน 45 วินาที 72°C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และที่อุณหภูมิ 72°C นาน 7 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปแยกด้วยเครื่อง gel electrophoresis ที่ 150 โวลต์ นาน 8 นาที โดยใช้ 2 % agarose gel ที่มี ethidium bromide 1 µl ผสมอยู่ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator การอ่านและแปลผล HGH band จะปรากฏที่ตำแหน่ง 1024 bp ส่วน HPA-12w และ HPA-16w band จะปรากฏที่ตำแหน่ง 307 bp และ 267 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



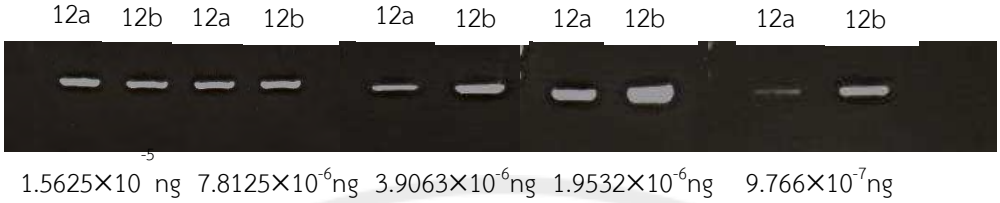
ภาพที่ 1 แสดงการอ่านผลการตรวจ HPA-12 and HPA-16 genotyping โดยวิธี PCR-SSP จะปรากฏ band ของ PCR product ของ Internal control ตำแหน่ง 1024 bp และ specific band ของ HPA-12w และ HPA-16w ตำแหน่ง 307 bp และ 267 bp M คือ DNA marker (TrackIt™)

ผลการทดลอง

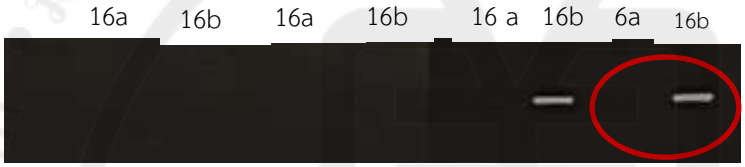
จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ของ HPA-12w และ HPA-16w ได้ผลคือ 9.6 µM ไพรเมอร์ของ HGH คือ 6.4 µM ส่วนการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมทำให้ผลการตรวจถูกต้องและชัดเจนที่สุดคือ 64°C (ภาพที่ 2) การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ของ HPA-12b และ HPA-16b (gBlocks Gene Fragment) โดยเริ่มทดสอบตั้งแต่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$ ng แล้วเจือจางแบบ two fold dilution ลงไปเรื่อยๆ ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ PCR-SSP ตามสภาวะที่เหมาะสมของการทดลองนี้ คือ 6.11×10^{-8}ng และ 1.25×10^{-4}ng ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ในการตรวจหายีน HPA-12w และ HPA-16w genotyping ของดีเอ็นเอผู้บริจาคเกล็ดเลือดจำนวน 100 ตัวอย่าง ได้ผลเป็นจีโนไทป์ HPA-12a12a และ HPA-16a16a ทั้ง 100 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 ผลการทำ PCR optimization หาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยแบ่งเป็น 3 โปรแกรมแตกต่างที่อุณหภูมิ annealing โปรแกรมที่ 1 มีอุณหภูมิ 67°C โปรแกรมที่ 2 มีอุณหภูมิ 65°C โปรแกรมที่ 3 มีอุณหภูมิ 64°C โดยใช้ดีเอ็นเอควบคุมสำหรับไพรเมอร์ HPA-12w ได้แก่ HPA-12a12a, HPA-12a12b และ HPA-12b12b และดีเอ็นเอควบคุมสำหรับไพรเมอร์ HPA-16w ได้แก่ HPA-16a16a และ HPA-16b16b พบว่าที่โปรแกรม 3 ให้ผลจีโนไทป์ถูกต้องชัดเจนที่สุด



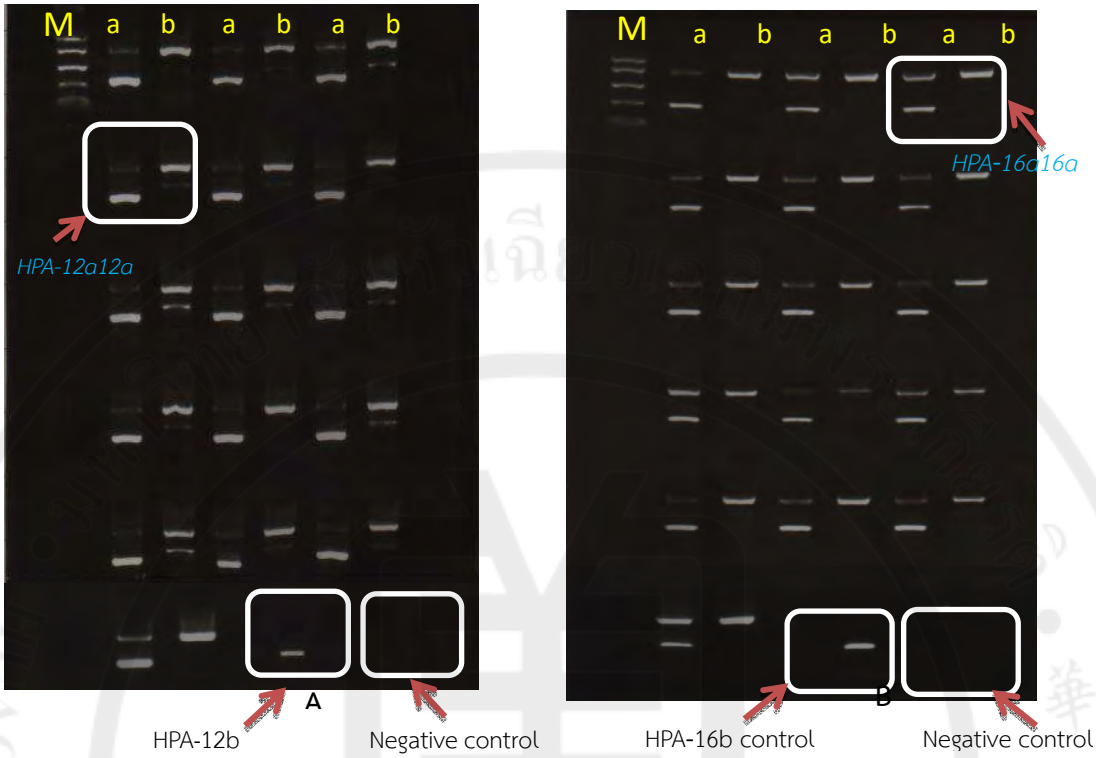
(A)



(B)

ภาพที่ 3 **(A)** แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-12b control ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเริ่มจากความเข้มข้น 1×10^{-3} ng ถึง 6.11×10^{-8}ng พบว่าที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} ng ถึง 1.221×10^{-7}ng (แสดงภาพที่ความเข้มข้น 1.5625×10^{-5} ng ลงมา) เกิด false positive ขึ้นที่หลอด HPA-12a ที่ความเข้มข้น 6.11×10^{-8}ng ไม่พบ false positive ขึ้นที่หลอด HPA-12a ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-16b control ที่สังเคราะห์ขึ้นคือ ความเข้มข้น 6.11×10^{-8} ng

(B) แสดงการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-16b control ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยเริ่มจากความเข้มข้น 1×10^{-3} ng ถึง 1.25×10^{-4} ng พบว่าที่ความเข้มข้น 1.25×10^{-4} ng ไม่พบ false positive ขึ้นที่หลอด HPA-16a ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HPA-16b control ที่สังเคราะห์ขึ้นคือ 1.25×10^{-4} ng



ภาพที่ 4 ตัวอย่างผลการตรวจ HPA-12w genotyping (A) และ HPA-16w genotyping (B) ในหลอด HPA-12b พบ non specific band จางๆ แต่อยู่ในตำแหน่งสูงกว่า specific M คือ DNA marker (TrackIt™) (Invitrogen™, USA)

สรุปและวิจารณ์ผล

การตรวจหาแอนติเจน HPA มีหลายวิธี ในอดีตตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น น้ำยาแอนติซีรัมที่ใช้ตรวจมีไม่ครอบคลุมระบบทั้งหมด และเป็นการตรวจหาแอนติเจนบนเกล็ดเลือดจึงจำเป็นต้องใช้เกล็ดเลือดปริมาณมาก แต่เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีอาการเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) ปัจจุบันจึงไม่นิยมตรวจหาชนิดแอนติเจน HPA ด้วยเทคนิคนี้ โดยการใช้วิธีทางโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกมากกว่า ราคาประหยัด และให้ผลถูกต้องแม่นยำสูงกว่าวิธีซีโรโลยี โดยวิธีที่นิยมมากคือ PCR-SSP เนื่องจากวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่เฉพาะเจาะจงและมีราคาแพงเหมือนบางเทคนิค เช่น real-time PCR หรือ DNA sequencing base typing ดังนั้นวิธี PCR-SSP จึงเป็นวิธีที่ยังนิยมในงานประจำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งมีงบประมาณไม่มาก อย่างไรก็ตามวิธี real-time PCR ก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมรองลงมา เพราะมีความเหมาะสมในการตรวจในผู้บริจาคที่มีจำนวนมาก (20) การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี PCR-SSP สำหรับตรวจจีโนไทป์ของระบบ HPA-12w และ HPA-16w โดยใช้น้ำยา PCR master mix สำเร็จรูป ซึ่งสามารถลดขั้นตอนการเตรียมน้ำยาลง โดยราคาไม่แตกต่างจากเดิม (ประมาณ 100 บาทต่อตัวอย่าง) ซึ่งช่วยให้การทำงานประจำสะดวกและสามารถทำการตรวจได้ง่ายขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ตรวจจีโนไทป์ของดีเอ็นเอผู้บริจาคเกล็ดเลือดจำนวนทั้งหมด 100 ราย พบว่าทั้ง 100 ตัวอย่างให้ผลจีโนไทป์เป็น HPA-12a12a และ HPA-16a16a (100%) หรือมีอัลลีล *HPA-12a* คิดเป็น 100% จากรายงานการตรวจหาจีโนไทป์ของ HPA-12w และ HPA-16w ในแถบเอเชียยังมีไม่มาก การศึกษาส่วนใหญ่

พบว่าผลจีโนไทป์เป็นแบบ HPA-12a12a และ HPA-16a16a เกือบ 100% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nie Y-M และคณะ (6) และงานวิจัยของ Feng ML และคณะ (7) ที่ได้ระบุว่าพบยีน *HPA-12a12a* และ *HPA-16a16a* 100% ในชาวจีนกวางตุ้งและชาวจีนฮั่น ดังนั้นแนวโน้มการเกิดปัญหา alloimmunization จากแอนติเจนสองระบบนี้จึงมีไม่มาก แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังเป็นเพียงการศึกษานำร่องที่ใช้ตัวอย่างตรวจจำนวนไม่มาก จึงควรเพิ่มขนาดประชากรศึกษาให้มากขึ้น เพื่อให้ได้ผลความถี่ของอัลลีลที่ถูกต้องและการพยากรณ์การเกิด alloimmunization ได้แม่นยำยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Sudwilai Y., Paupairoj C., Komwilaisak P., Romphruk A., Leelawat C., Romphruk A. Selection of standard platelet for platelet antibody detection. J Med Tech Phy Ther. 2011;24(1):29-40.
2. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. Transfus Apher Sci. 2003;28(3): 297-305.
3. The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) [Internet]. United Kingdom: The European Bioinformatics Institute. Availablefrom: https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table2.html.
4. Curlis BR, and McFarland JG. Human platelet antigens – 2013. Vox Sang. 2014;106(2): 93-102.
5. Sachs U., Kiefel v. Bo¨hringer M., Afshar-Kharghan v., Kroll H., Santoso s. Single amino acid substitution in human platelet glycoprotein Ib□ is responsible for the formation of the platelet-specific alloantigen . Transfus Med. 2000;95(5):1849-55.
6. Nie YM., Zhou HJ., Fu YS., Wang CX., Ma JP. The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors. Transfus Med. 2010; 20(6):376-82.
7. 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(5):369-74.
8. Kongmaroeng C., Semsri S., Kitporka P., Mongkolsuk T., Kengkate M., Human platelet antigen-7 to -13 genotyping by modification Polymerase Chain Reation-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) method. Samutprakarn: Huachiew Chalermprakiet University; 2006.
9. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S. Nomenclature of human platelet antigens. Vox Sang. 2003;85(3): 240-5.
10. Kiefel V, Konig C, Kroll H, and Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. Transfusion. 2010;41(6):766-70.
11. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. Transfus Apher Sci. 2003;28(3): 297-305.

12. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. Pediatrics. 2014;133(4): 715-21.
13. Padhi P, Parihar GS, Stepp J, Kaplan R. Post-transfusion purpura: a rare and life-threatening aetiology of thrombocytopenia. BMJ Case Rep. 24; published online 24 May 2013.
14. Valder R. Arruda. A novel strategy for the screening for platelet refractoriness: prospects and limitations. Rev Bras Hematol Hemoter. 2013;35(4): 233–4.
15. Kengkate M., Kanunthong S., Kupatawintu P., Srisuddee A., Phiancharoen S. and Roekchai C. 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. J Hematol Transfu Med. 2016;26:107-14.
16. Kupatawintu P, Nathalang O, Jitjak N, Sealee S, and O-Charoen R. The incidence of platelet thrombocytopenic patients. J Hematol Transfu Med. 2000;10: 123-7.
17. Kengkate M. Butthep P., Kupatawintu P., Kanunthong S., Chantratita W., Nathalang O. Genotyping of HPA-1 to -7 and -15 in the Thai population using multiplex PCR. Transfus Med. 2012;22(4):272-6.
18. 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(4):225-30.
19. Jallu V., Meunier M., Bre´ment M., Kaplan C. A new platelet polymorphism Duv[a] localized within the RGD binding domain of glycoprotein IIIa, is associated with neonatalthrombocytopenia. Blood. 2002;99(12): 4419-56.
20. 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(2): 94–9.