

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโรคเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง

นางนุช ลีระชัยนันท์<sup>1</sup> ประกายวรรณ เกษเกษม<sup>1</sup> นภาพร อัจฉราฤทธิ์<sup>2</sup> วีระศักดิ์ ศาสนกุล<sup>1</sup>  
 คัชริน อายรุไชย<sup>2</sup> สุพร ตริพงษ์ภรณ์<sup>1</sup> และ อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ <sup>2</sup>ศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

**บทคัดย่อ :** โรคเกล็ดเลือดต่ำ (immune thrombocytopenic purpura) เกิดจากภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นต่อเกล็ดเลือด เป็นปัญหาที่พบบ่อยในเด็กอายุ 1-9 ปี พบว่าร้อยละ 20 ของผู้ป่วยจะเกิดเป็นเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง ในปัจจุบันยังไม่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สามารถยืนยันการวินิจฉัยโรคได้ การศึกษาที่จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะของการตรวจ platelet associated antibody ชนิด IgG (PAIgG) โดยมีผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งสิ้น 56 ราย เป็นผู้ป่วย 33 รายและกลุ่มควบคุม 23 ราย พบว่าค่าแอนติบอดีที่มากกว่าร้อยละ 6.09 มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 66.7 และ 65.2 ตามลำดับ และค่าที่มากกว่าร้อยละ 22.4 จะมีความจำเพาะร้อยละ 100 และพบว่าระดับของแอนติบอดีมีความสัมพันธ์กับจำนวนเกล็ดเลือด ดังนั้น การตรวจ PAIgG สามารถใช้ช่วยในการวินิจฉัยเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง (ITP) ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ PAIgG มีค่าสูง

**Key Words :** ● เกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง ● แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2552;19:171-5.

โรคเกล็ดเลือดต่ำในเด็กหรือ Immune thrombocytopenic purpura (ITP) เป็นโรคเลือดออกง่ายที่เกิดขึ้นภายหลังที่พบได้บ่อยที่สุดในเด็ก โดยมีอุบัติการณ์ประมาณ 2.6-9.5 รายต่อประชากร 100,000 คนต่อปี อายุที่พบอยู่ในช่วง 1-9 ปี<sup>1,2</sup> สาเหตุของการเกิด ITP ที่พบบ่อยคือการติดเชื้อไวรัส กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันผ่านทาง antigen presenting cell (APC) ซึ่งนำเสนอ antigen ของเชื้อนั้นบนผิวเซลล์ ทำให้มีการกระตุ้น T helper (Th) cell ผ่านทาง receptor CD80/86, CD40 บน APC และ CD28, CD154 บน Th cell หลังจากนั้น Th cell จะกระตุ้น lymphocyte ชนิด B cell ให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่มีผลต่อ receptor บนเกล็ดเลือดชนิด glycoprotein IIb/IIIa และ glycoprotein Ib/IX หรือ glycoprotein Ia/IIa เกล็ดเลือดที่จับกับภูมิคุ้มกันดังกล่าวจะถูกทำลายโดย macrophage ใน reticuloendothelial system โดยเฉพาะที่ม้าม นอกจากนี้ Th cell ยังมีการหลั่งสาร IFN- $\gamma$  และ IL2 กระตุ้น cytotoxic T lymphocyte (CTL) ให้ทำลายเกล็ดเลือดที่ผิดปกติด้วย<sup>3-5</sup>

การพยากรณ์โรคพบว่าร้อยละ 92 ของผู้ป่วยจะมีเกล็ดเลือด

มากกว่า 50,000 เซลล์/ไมโครลิตร ที่ 1 เดือน และ ร้อยละ 78 ของผู้ป่วยจะมีเกล็ดเลือดปกติ >150,000 เซลล์/ไมโครลิตร ที่ 6 เดือน ดังนั้น ประมาณร้อยละ 20-30 ของผู้ป่วยจะมีเกล็ดเลือดต่ำกว่า 150,000 เซลล์/ไมโครลิตร ที่มากกว่า 6 เดือน ถือเป็นภาวะเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง (chronic ITP) การรักษาในผู้ป่วย chronic ITP จะมีการให้การรักษาเมื่อเกล็ดเลือดต่ำกว่า 20,000 เซลล์/ไมโครลิตร ยาที่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มเกล็ดเลือดได้คือ ยากลุ่ม immunosuppressive เช่น corticosteroid, cyclophosphamide และ azathioprine นอกจากนี้มีรายงานการใช้ anti CD20 (Rituximab) และ thrombopoietin การตัดม้ามมักนิยมทำในเด็กโตที่มีเกล็ดเลือดต่ำและมีความเสี่ยงต่อภาวะเลือดออกที่รุนแรง<sup>6</sup>

เนื่องจากในปัจจุบันไม่มีการตรวจที่จำเพาะในการวินิจฉัยโรค การวินิจฉัยจำเป็นต้องอาศัยประวัติเลือดออกแบบเฉียบพลัน ไม่มีไข้ ตรวจร่างกายไม่พบว่ามีตับ ม้าม หรือต่อมน้ำเหลืองโต อายุของผู้ป่วยประมาณ 1-9 ปี ตรวจ complete blood count พบว่ามีเกล็ดเลือดต่ำเพียงอย่างเดียว โดยมีเม็ดเลือดขาวและความเข้มข้นของเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ การตรวจอย่างอื่นที่ช่วยยืนยันการวินิจฉัยคือ การตรวจไขกระดูก (bone marrow aspiration) พบว่าจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวปกติ เซลล์ต้นกำเนิดเกล็ดเลือด (megakaryocyte) มีจำนวนปกติหรือเพิ่มขึ้น อาจพบว่ามีตัวอ่อนของ megakaryocyte เพิ่มขึ้น<sup>7</sup> อย่างไร

ได้รับต้นฉบับ 2 มิถุนายน 2552 ให้ลงตีพิมพ์ 26 มิถุนายน 2552

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.นางนุช ลีระชัยนันท์ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระรามหก เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 E-mail: rnsrb@mahidol.ac.th

ก็คืออาการแสดงและการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังกล่าวอาจพบได้ในโรคเกล็ดเลือดต่ำจากสาเหตุอื่นเช่น Bernard-Soulier, May Hegglin anomaly และ Wiskott-Aldrich syndrome ทำให้บางครั้งผู้ป่วยกลุ่มนี้ถูกรักษาแบบ chronic ITP โดยได้รับยาที่เกินความจำเป็น<sup>8</sup>

ดังนั้นการศึกษาการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ช่วยในการวินิจฉัย ITP ที่ผ่านมาได้แก่การตรวจ antibody ต่อเกล็ดเลือดซึ่งสามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น การตรวจหา antibody ใน serum ของผู้ป่วยด้วยวิธี solid phase red cell adherence test (SPRCA), microplate enzyme immunoassay (EIA) หรือการตรวจ antibody บน เกล็ดเลือดด้วยวิธี platelet suspension indirect immunofluorescence test (PSIF) และ ELISA พบว่ามีความไว (sensitivity) เพียงร้อยละ 17-39<sup>9</sup> ต่อมาจึงมีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี flow cytometry ทำให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น ในช่วง ร้อยละ 49-66 และ 78-93 ตามลำดับ<sup>10,11</sup> แล้วแต่การศึกษา ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค่า sensitivity และ specificity ของการตรวจ platelet associated antibody ชนิด IgG (PAIgG) ว่าสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรัง (chronic ITP) ได้หรือไม่

**ขั้นตอนและวิธีทดลอง**

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย

ผู้ป่วยเด็กอายุ ≤ 18 ปีที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเกล็ดเลือด

ต่ำเรื้อรังโดยมีปริมาณเกล็ดเลือด ≤ 100,000 เซลล์/ไมโครลิตร และการตรวจเลือดให้ผลลบต่อ anti HIV, anti dDNA

**กลุ่มควบคุม**

คนปกติที่ไม่มีโรคประจำตัว และมีเกล็ดเลือดอยู่ในเกณฑ์ปกติ

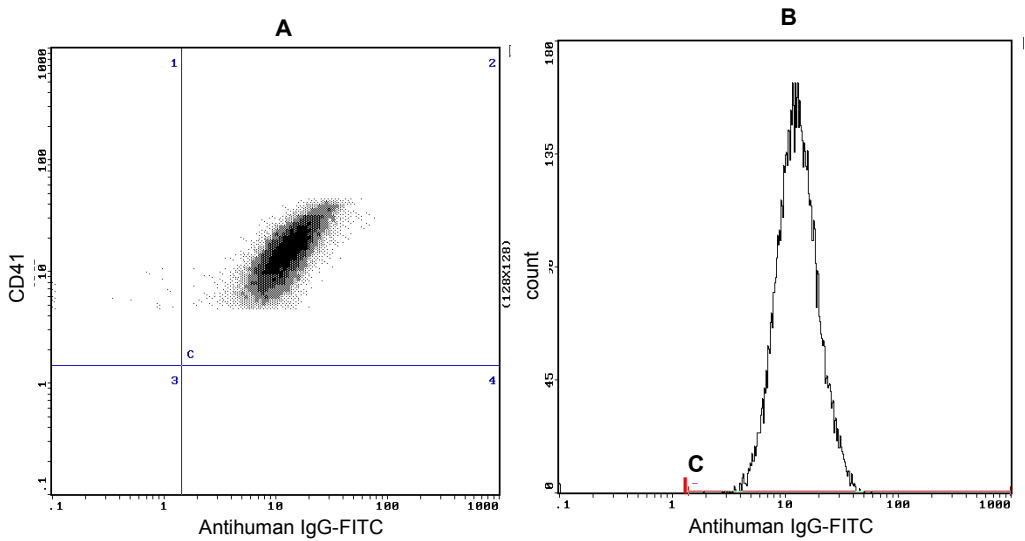
**การตรวจ Platelet associated antibody (PAIgG)**

หลังจากได้รับความยินยอมจากผู้ปกครอง ผู้ป่วยจะได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดเลือดที่มีสาร EDTA นำมาปั่นกับเกล็ดเลือด (platelet rich plasma) ด้วยความเร็ว 200 x g หลังจากนั้นเกล็ดเลือดถูกล้างด้วย PBS + 0.5% BSA + 10mM EDTA และปั่นกับเกล็ดเลือดเข้มข้นด้วยความเร็ว 700 x g ทั้งหมด 4 ครั้ง หลังจากนั้นครั้งสุดท้ายจะเติม buffer (PBS containing 1% PBS + 0.1% BSA) แบ่งเกล็ดเลือดที่เตรียมได้เป็น 2 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติม rabbit-antihuman IgG-FITC + CD-41-PE หลอดแรก และ rabbit IgG-FITC + CD-41-PE ในหลอดที่สองเพื่อเป็นตัวควบคุม ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในที่มีदन 30 นาทีจึงล้างด้วย PBS + 0.1% BSA 1 ครั้ง ทำการวัดเกล็ดเลือดที่มี antibody โดยวิธี flow cytometry ค่า platelet antibody ที่ได้วัดเป็นเปอร์เซ็นต์<sup>12</sup> (รูปที่ 1)

**ผลการศึกษา**

จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 33 ราย และ กลุ่มควบคุม 23 ราย ค่ากึ่งกลางมาตราฐานอายุ เพศหญิง: ชาย ค่ากึ่งกลางมาตราฐานของจำนวนเกล็ดเลือด และ ค่า PAlGg ของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่ม

**รูปที่ 1** แสดงตัวอย่างผลการตรวจ Platelet associated antibody (PAIgG) A) immunoglobulin positive platelet (CD41), B) histogram ของเกล็ดเลือดที่มีผลบวกต่อ antibody และ C) ค่า cut-off negative control



ควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า อายุ ค่ากึ่งกลางมาตรฐานของจำนวนเกล็ดเลือด และ ค่า PAIgG มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม การกระจายตัวของค่า PAIgG ดังแสดงในรูปที่ 2

PAIgG ที่มากกว่าร้อยละ 6.09 มีค่า sensitivity และ specificity ในการวินิจฉัยโรค เท่ากับร้อยละ 66.7 และ 65.2 ตามลำดับ และค่า PAIgG ที่มากกว่าร้อยละ 22.4 จะมีค่า sensitivity และ specificity ในการวินิจฉัยโรค เท่ากับร้อยละ 45.5 และ 100 โดยมีค่า area under ROC curve เท่ากับ 0.76 นอกจากนี้ยังพบว่าค่า PAIgG มีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนเกล็ดเลือด โดยมีค่า  $r = -0.42$ ,  $P = 0.004$  (รูปที่ 3)

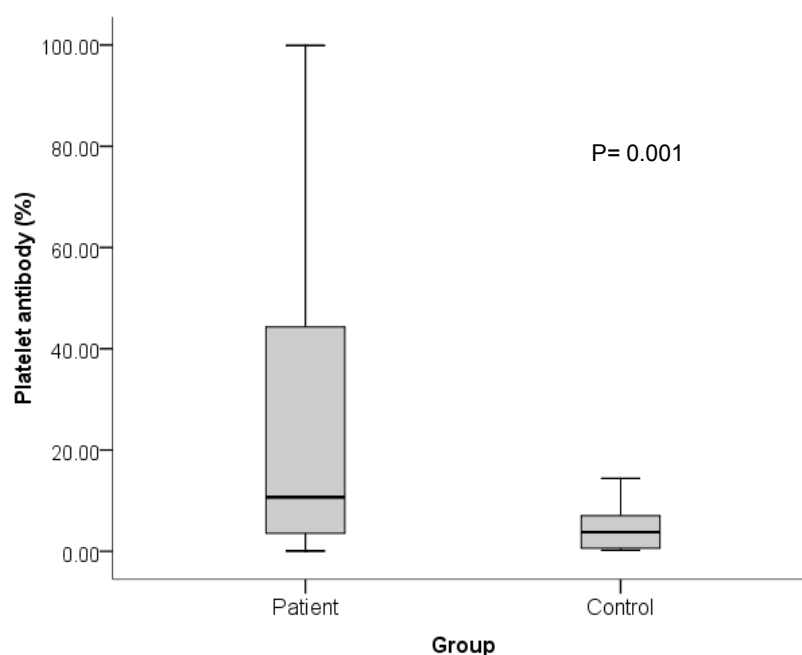
## วิจารณ์

ปัญหาเกล็ดเลือดต่ำเรื้อรังในผู้ป่วยเด็ก นอกจากเกิดจาก chronic ITP แล้วโรคเกล็ดเลือดต่ำทางพันธุกรรมบางโรคอาจมาพบแพทย์ด้วยปัญหาแบบเดียวกัน การวินิจฉัยด้วยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น รวมทั้งไขกระดูก บางครั้งอาจแยกโรคจากกันไม่ได้<sup>8</sup> การตรวจหา antibody ต่อเกล็ดเลือด เป็นการตรวจที่มีการศึกษามากขึ้นในปัจจุบัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการช่วยการวินิจฉัยโรค ITP การศึกษานี้เลือกใช้การตรวจ antibody ชนิด PAIgG เนื่องจากเป็นการตรวจไม่ยุ่งยาก ราคาถูกกว่า เมื่อเทียบกับการวัด specific antibody ชนิด anti GPIIb/IX, anti GPIIb/IIIa<sup>13</sup> หรือ การวัด anti IgM

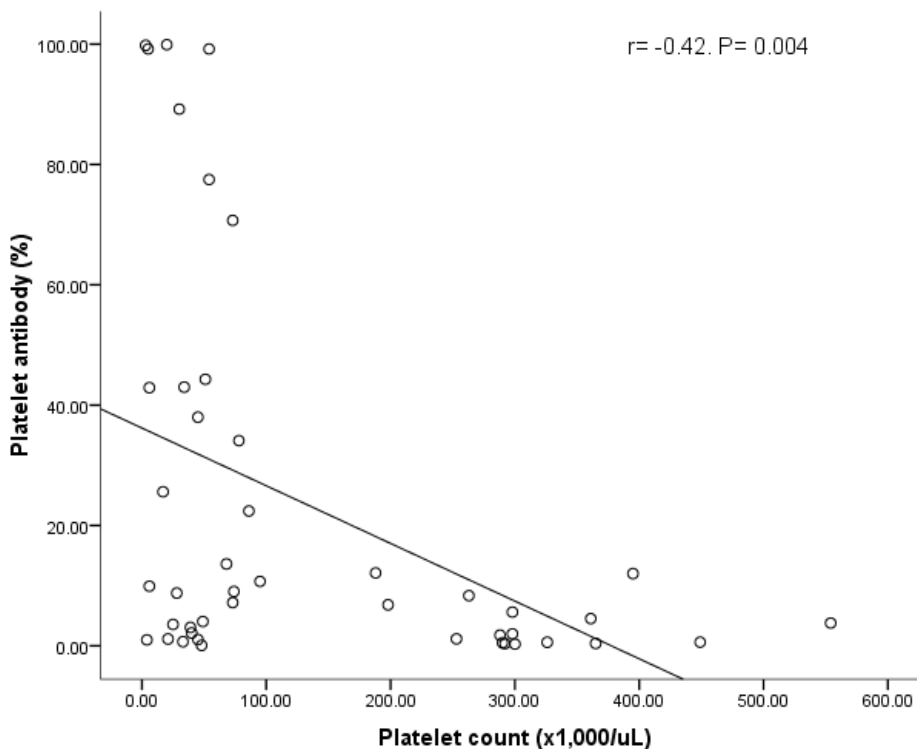
ตารางที่ 1 ข้อมูลของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

Parameter	Patient (N= 33)	Control (N= 23)	P-value
Median age (interquartile range, y)	9.5 (5.8-12.1)	15 (11-27)	0.005
Female : Male	2 : 1	1.5 : 1	0.7
Median platelet count (x10 <sup>3</sup> /uL)	40.0	298	<0.001
Interquartile range	18-54	269-364	
Median platelet antibody (%)	10.7	3.8	0.001
Interquartile range	0.5-44.3	0.2-7	

รูปที่ 2 ค่า Platelet associated antibody (PAIgG) ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม



**รูปที่ 3** แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Platelet antibody และ จำนวนเกล็ดเลือด



และ IgA รวมด้วย<sup>12</sup> นอกจากนี้เมื่อมีการศึกษาในผู้ป่วย chronic ITP พบว่า antibody ลดลงเมื่อเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น<sup>14</sup> จึงน่าจะช่วยช่วยในการวินิจฉัยได้ ถึงแม้ว่าการตรวจ PAIgG อาจมีข้อจำกัด ทั้งนี้เนื่องจาก ในคนปกติอาจพบ nonspecific antibody ชนิด IgG บนเกล็ดเลือดได้<sup>10</sup> รวมทั้งอาจพบได้ในภาวะต่างๆ เช่น การติดเชื้อภาวะ disseminated intravascular coagulation<sup>10</sup> แต่อย่างไรก็ดี ค่า antibody ที่พบในภาวะอื่นมีระดับ antibody น้อยกว่าผู้ป่วย ITP<sup>12</sup> จากการศึกษาพบว่า การตรวจ PAIgG ที่มีค่ามากกว่าร้อยละ 6.09 มี sensitivity และ specificity ในการช่วยวินิจฉัยโรคเท่ากับร้อยละ 66.7 และ 65.2 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงที่เคยทำการศึกษามา ก่อนหน้านี้ ถึงแม้ว่าค่า area under ROC curve จะอยู่ในค่าที่ยอมรับได้ทางสถิติ แต่อาจจะไม่มีความไวและความจำเพาะที่ดีพอถ้าใช้ค่า antibody เพียงอย่างเดียวในการวินิจฉัย อย่างไรก็ตามถ้าต้องการใช้การตรวจ PAIgG เพื่อดูความจำเพาะของการวินิจฉัยโรค chronic ITP พบว่าค่าที่มากกว่าร้อยละ 22.4 จะได้ความจำเพาะร้อยละ 100 จึงอาจใช้ค่า PAIgG ร่วมกับข้อมูลจากประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น เพื่อช่วยในการยืนยันการวินิจฉัยโรค chronic

ITP นอกจากนี้จากผลการศึกษาพบว่าค่า PAIgG ที่สูงยังมีแนวโน้มสัมพันธ์กับจำนวนเกล็ดเลือดที่ลดลงด้วย จึงน่าจะช่วยสนับสนุนว่า ภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่ร่างกายสร้างขึ้นมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรค ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ ผู้เข้าร่วมวิจัยในกลุ่มควบคุมมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มผู้ป่วย และ อายุของกลุ่มควบคุมซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วย

สรุปการตรวจ PAIgG โดยวิธี flow cytometry มีความไวและความจำเพาะที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับวิธีอื่นเช่นการตรวจด้วยวิธี ELISA แต่ก็ยังเป็น การตรวจที่ยังไม่ดีพอ ในทางปฏิบัติค่า PAIgG ที่มีค่าสูง อาจให้ความจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น และมาช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรค chronic ITP ได้

**กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณแพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่ให้การดูแลรักษาผู้ป่วย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ ในส่วนเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์แพทย์หญิงอำไพพรรณ จวนสัมฤทธิ์ ประจำปี พ.ศ. 2549

## เอกสารอ้างอิง

1. Segal JB, Powe NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2377-83.
2. Fogarty PF, Segal JB. The epidemiology of immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:515-9.
3. Cines DB, McMillan R. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:511-4.
4. Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura of childhood. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:97-103.
5. Beardsley DS. ITP in the 21<sup>st</sup> century. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:402-7.
6. Rosthøj S, Hedlund-Treutiger I, Rajantie J, et al. Duration and morbidity of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in children: A prospective Nordic study of an unselected cohort. *J Pediatr.* 2003;143:302-7.
7. George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood.* 1996;88:3-40.
8. Bader-Meunier B, Proulle V, Trichet C, et al. Misdiagnosis of chronic thrombocytopenia in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:548-52.
9. Biglino P, Perutelli P, Mori PG. Platelet antibody detection in pediatric immune thrombocytopenic purpura: evaluation of three screening methods. *Vox Sang.* 1997;72:242-6.
10. Beardsley DS, Ertem M. Platelet autoantibodies in immune thrombocytopenic purpura. *Transfus Sci.* 1998;19:237-44.
11. Yildirmak Y, Yanikkaya-Demirel G, Palanduz A, Kayaalp N. Antiplatelet antibodies and their correlation with clinical findings in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol.* 2005;113:109-12.
12. Nishioka T, Yamane T, Takubo T, Ohta K, Park K, Hino M. Detection of various platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;68:37-42.
13. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1992;79:1441-1446.
14. Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y et al. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2004;124:91-6.

## Platelet Antibody in Children with Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura

Nongnuch Sirachainan<sup>1</sup>, Praguaywan Kadegasem<sup>1</sup>, Napaporn Archararit<sup>2</sup>,  
Werasak Sasanakul<sup>1</sup>, Katcharin Aryurachai<sup>2</sup>, Suporn Treepongkaruna<sup>1</sup>,  
and Ampaiwan Chuansumrit<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pediatrics, <sup>2</sup>Research center, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

**Abstract :** Immune thrombocytopenic purpura (ITP), an autoimmune disease, commonly occurs in children age 1-9 years. Around 20% of all patients develop chronic ITP. However, the diagnosis of chronic ITP may mimic the diagnosis of other thrombocytopenic diseases. Therefore, this study aims to identify the usefulness of platelet associated antibody (PAIgG) for the diagnosis of chronic ITP. This study enrolled 33 children with chronic ITP and 23 controls. The sensitivity and specificity for the diagnosis of chronic ITP when level above 6.09% were 66.7% and 65.2%, respectively. PAIgG level above 22.4% had 100% specificity for the diagnosis of chronic ITP. In addition, PAIgG level had negative correlation with the number of platelet count. Therefore, PAIgG level can be a supportive test for the diagnosis of chronic ITP especially when the level is high.

**Key Words :** ● Chronic immune thrombocytopenic purpura ● PAIgG

*J Hematol Transfus Med* 2008;19:171-5.

