

การทดสอบความเข้ากันได้ของเฮลแอลด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี : ทางเลือกหนึ่งของการทดสอบ  
ในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลุกลงถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช  
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

Flow cytometric crossmatch : an alternative technique of HLA compatibility testing in  
deceased donor kidney transplant waited-list



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and  
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทดสอบความเข้ากันได้ของเฮลแอลเอด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี : ทางเลือกหนึ่งของการทดสอบในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย
โดย	น.ส.นุชนันท์ โชคทวีศักดิ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ภาวิณี คุปตวินทุ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ ไทวนำชัย

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาดนันท์ รัชวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ภาวิณี คุปตวินทุ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐวุฒิ ไทวนำชัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์พิเศษ พลตรีหญิง ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง)

นุจนันท์ โชคทวีศักดิ์ : การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี : ทางเลือกหนึ่งของการทดสอบในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย. ( Flow cytometric crossmatch : an alternative technique of HLA compatibility testing in deceased donor kidney transplant waited-list) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปาลณี อัมรานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ภาวิณี คุปตวินทุ,ผศ. นพ.ณัฐวุฒิ ไทวนำชัย

การตรวจความเข้ากันได้ของ Human Leukocyte Antigen (HLA) ก่อนการปลูกถ่ายไต ทำขึ้นเพื่อตรวจจับ Donor Specific Antibody (DSA) ต่อผู้บริจาค ที่อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาปฏิเสธอวัยวะ โดยเทคนิคที่ใช้ในปัจจุบันคือเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch ( CDC- XM) และ Anti- Human Globulin Complement- dependent microcytotoxicity crossmatch (AHG-CDC) มีความไวจำกัด ไม่สามารถตรวจจับ DSA ปริมาณน้อยที่ส่งผลต่ออัตราการรอดของไตได้ ขณะที่เทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry crossmatch, FCXM) มีความไวสูงกว่า แต่พบปัญหาผลบวกปลอมจากแอนติบอดีที่ไม่เกี่ยวข้องทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสที่จะได้รับการปลูกถ่ายไต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงความไวและความจำเพาะของเทคนิค FCXM โดยศึกษาในลิ้มฟิชย์ต์จากผู้บริจาคไตสมองตายกับน้ำเหลืองตัวอย่างที่ทราบผล DSA จำนวน 20 ตัวอย่างเพื่อประเมินเทคนิคแล้วทดสอบเปรียบเทียบกับเทคนิค CDC,AHG-CDC ในกลุ่มผู้ป่วยจำนวน 199 ตัวอย่าง พบว่าในขั้นตอนการประเมินผลเทคนิค FCXM มีความไวและความจำเพาะในกลุ่ม T cell 71% และ 100% ตามลำดับ ส่วน B cell พบว่าความไวเท่ากับ 75% และความจำเพาะ 100% และสอดคล้องกับผล DSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อทดสอบกับผู้ป่วยให้ผลสอดคล้องกับเทคนิค CDC, AHG-CDC จำนวน 190 ตัวอย่าง คิดเป็น 95.47% พบผลบวกปลอม จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.0% ผลการทดสอบความเข้ากันได้และประเมินประสิทธิภาพเทคนิค FCXM นี้สรุปได้ว่าเหมาะสมที่จะนำไปทดลองใช้ทดแทนเทคนิค CDC และ AHG-CDC แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มที่มี DSA ก่อนนำไปใช้จริงในอนาคต

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทาง จุลชีววิทยาทางการแพทย์และ วิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6076753137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Kidney Transplantation, Flow cytometry Crossmatch, FCXM

Nuchjarnun Choktaweesak : Flow cytometric crossmatch : an alternative technique of HLA compatibility testing in deceased donor kidney transplant waited-list. Advisor: Assoc. Prof. PALANEE AMMARANOND, Ph.D. Co-advisor: Pawinee Kupatawintu, Asst. Prof. Natavudh Townamchai, M.D.

The Human Leukocyte Antigen compatibility test before kidney transplantation is done to detect Donor Specific Antibody (DSA) which possibly be the cause of organ rejection. The current technique, Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC) and Anti-Human Globulin Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (AHG-CDC) are still limited in terms of sensitivity. Flow cytometry technique (FCXM) has been reported to give high sensitivity. There was a problem with false positives (FP) by irrelevant antibodies. Additionally, FP data will decrease the opportunity of patients to receive organs and keep them longer on the waiting list. To solve this problem, our study aims to improve sensitivity and specificity of FCXM technique. The study was performed in deceased donor's lymphocytes with 20 known DSA serums to validate the technique and 199 patient's serum that was tested by CDC and AHG-CDC. The validation result was shown sensitivity and specificity 71% and 100% respectively in the T cell, while the B cell showed 75% sensitivity and 100% specificity. There was a statistically significant between the DSA and FCXM ( $p < 0.05$ ). The crossmatching result was shown the concordance between CDC, AHG-CDC and FCXM, 190 of 199 samples (95.47%) and Eight samples (4.0%) were found as FP. We concluded that these techniques were suitable to perform in routine. However, further studies in the sample with DSA should be investigated before the implementation.

Field of Study: Molecular Science of Student's Signature .....  
 Medical Microbiology and  
 Immunology

Academic Year: 2020 Advisor's Signature .....  
 Co-advisor's Signature .....  
 Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาและวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้เป็นอย่างดีด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก คุณภาวิณี คุปตวิณฑุ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ณัฐวุฒิ ไตวนำชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความเมตตารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ รวมถึงให้ความช่วยเหลือดูแลในการแก้ไขปัญหาต่างๆให้ผู้วิจัยในทุกด้านมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน คณาจารย์ และผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำ วิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาการศึกษาและกรุณารับเป็นคณะกรรมการนับตั้งแต่การสอบโครงร่าง การติดตามความก้าวหน้างานวิจัยแล้วเสร็จ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเม็ตเล็อดขาวและเกล็ดเลือด ศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย รวมถึงเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนข้อมูลตัวอย่าง และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนและผู้ร่วมงานของผู้วิจัยที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นุจนันท์ โชคทวีศักดิ์

## สารบัญ

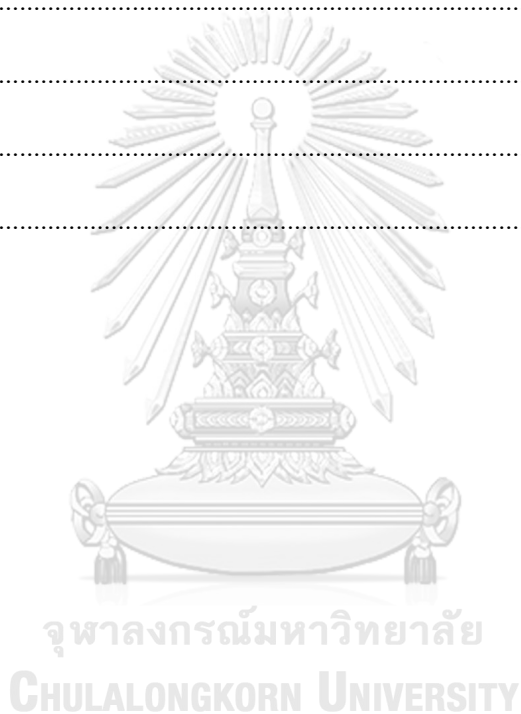
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	3
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	4
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 .....	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	6
1.การปลูกถ่ายไต (Kidney Transplantation).....	6
2.งานปลูกถ่ายไตในประเทศไทย.....	7
3 การปฏิเสธอวัยวะ (Rejection).....	8
3.1 Hyperacute rejection.....	8
3.2 Acute rejection .....	9
3.3 Chronic rejection .....	10
4 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อการปลูกถ่ายไตและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง .....	11



4.1 การตรวจหมู่เลือดเอบีโอ (ABO Blood Group Testing).....	12
4.2 การตรวจหาชนิดของแอนติเจนเอชแอลเอ (HLA Typing).....	14
4.3 การตรวจหาแอนติบอดี.....	17
4.4 การตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ (HLA Crossmatching).....	20
4.5 การแปลผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ .....	29
5. การคัดเลือกผู้ป่วยและการทดสอบความเข้ากันได้ในกรณีผู้บริจาคไตสมองตาย.....	33
6. การตรวจทางห้องปฏิบัติการในกรณีผู้บริจาคไตสมองตาย .....	35
บทที่ 3 .....	38
วิธีดำเนินงานวิจัย .....	38
1. สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	38
2. เครื่องมือ.....	39
3. การออกแบบงานวิจัย .....	40
4. วิธีการทดลอง.....	40
4.1 ประชากรและลักษณะกลุ่มตัวอย่าง .....	40
5. วิธีการศึกษาวิจัย .....	41
บทที่ 4 .....	48
ผลการทดลอง .....	48
1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	48
2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM.....	49
3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM.....	55
4. ผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ในกลุ่มตัวอย่าง.....	60
5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	63
6. เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ทำการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM..	65
บทที่ 5 .....	67



อภิปรายผลการทดลอง.....	67
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM .....	67
2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM.....	67
3. การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM ในกลุ่มตัวอย่าง.....	68
บทที่ 6 .....	73
สรุปผลการทดลอง.....	73
บรรณานุกรม.....	75
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก .....	80
ประวัติผู้เขียน .....	88



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ระยะของโรคไตเรื้อรัง (19).....	6
ตารางที่ 2	แสดงหมู่เลือดระบบเอบีโอที่เข้ากันได้ระหว่างผู้บริจาคและผู้รับอวัยวะ(24) .....	14
ตารางที่ 3	แสดงเกณฑ์การให้คะแนนและการแปลผลทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM (11).....	23
ตารางที่ 4	แสดงเกณฑ์การแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM ในกรณีที่มีการทดสอบกับน้ำเหลืองที่ทำปฏิกิริยากับ DTT (14).....	24
ตารางที่ 5	แสดงแนวทางการแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ (Crossmatching) และการประเมินความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตระหว่างผลการทดสอบจากเทคนิค CDC ร่วมกับ FCXM (11).....	32
ตารางที่ 6	แสดงข้อมูลผู้ป่วยและตัวอย่างน้ำเหลืองตามเกณฑ์การจัดสรรไตที่นำมาทดสอบ (N=199) .....	48
ตารางที่ 7	แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T cell ที่ใช้ Anti CD3 PE/Cy5 ที่ความเข้มข้นต่างกัน .....	52
ตารางที่ 8	แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B cell ที่ใช้ Anti CD19 PE ที่ความเข้มข้นต่างกัน .....	53
ตารางที่ 9	แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมย้อม Anti Human IgG ที่ติดฉลากด้วย FITC ที่ความเข้มข้นต่างกัน .....	54
ตารางที่ 10	แสดงค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับต่างๆ ของค่า LINEAR X-Median จากค่าMCS ในการทดสอบลิมโฟไซต์ชนิด T cell และ B cell กับน้ำเหลืองควบคุมลบจำนวน 38 ตัวอย่าง.....	55
ตารางที่ 11	แสดงค่า MCFS ของการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ลิมโฟไซต์ผู้บริจาคไตสมองตายกับตัวอย่างน้ำเหลืองที่ตรวจชนิดของ HLA Antibody แล้วแปลผลด้วยค่า cutoff ที่ SD ต่างๆ	56
ตารางที่ 12	แสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค FCXM กับ VXM โดยแยกพิจารณา T cell และ B cell.....	57
ตารางที่ 13	แสดงผล DSA และผลการเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค AHG-CDC ในกลุ่มตัวอย่างที่ผล VXM ไม่สอดคล้องกับ FCXM.....	58

ตารางที่ 14 แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ T cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค VXM และ FCXM.....	59
ตารางที่ 15 แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ B cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค VXM และ FCXM.....	59
ตารางที่ 16 แสดงค่า MCS และผลการทดสอบ FCXM ของตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันเมื่อเทียบกับผล CDC และ AHG-CDC .....	60
ตารางที่ 17 แสดงจำนวนของผลการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM เมื่อพิจารณาแยกกันระหว่าง T cell และ B cell.....	61
ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลของตัวอย่างในกลุ่ม T cell ให้ผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC และ AHG-CDC ไม่สอดคล้องกับเทคนิค FCXM .....	61
ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลของตัวอย่างในกลุ่ม B cell ให้ผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC และ AHG-CDC ไม่สอดคล้องกับเทคนิค FCXM .....	62
ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM เปรียบเทียบกับผล VXM ในกลุ่มตัวอย่างที่มี DSA.....	63
ตารางที่ 21 แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ T cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM.....	64
ตารางที่ 22 แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ B cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM.....	64
ตารางที่ 23 แสดงเวลาและขั้นตอนของการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM .....	66
ตารางที่ 24 ตารางแสดงค่า MCFS และผลการทดสอบ FCXM ของตัวอย่างทั้งหมด 199 ตัวอย่าง เทียบกับผล CDC และ AHG-CDC.....	80

## สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1	แสดงการเกิด Hyperacute rejection จากภายในเส้นเลือดของกราฟท์ (5).....	9
ภาพที่ 2	แสดงการเกิด Acute rejection จากเส้นเลือดภายในกราฟท์ (5) .....	10
ภาพที่ 3	แสดงการเกิด Chronic rejection จากเส้นเลือดภายในกราฟท์ (5).....	11
ภาพที่ 4	แสดงลักษณะของแอนติเจนของระบบเอบีโอบนผิวเม็ดเลือดแดง .....	13
ภาพที่ 5	แสดงองค์ประกอบของกลุ่มยีนควบคุม HLA ในมนุษย์เทียบกับ H-2 ในหนู (5).....	14
ภาพที่ 6	ภาพ 3 มิติโดยวิธี X-ray crystallography ของโครงสร้างโมเลกุล HLA Class I (5).....	15
ภาพที่ 7	ภาพ 3 มิติโดยวิธี X-ray crystallography ของโครงสร้างโมเลกุล HLA Class II (5).....	16
ภาพที่ 8	แสดงหลักการของการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Luminex® (28) .....	18
ภาพที่ 9	เปรียบเทียบความแตกต่างของส่วนประกอบและความสามารถของบีดส์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ ด้วยเทคนิค Luminex® (28).....	19
ภาพที่ 10	แสดงหลักการเทคนิค Virtual Crossmatch (VXM).....	21
ภาพที่ 11	แสดงหลักการเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) (29).....	23
ภาพที่ 12	แสดงหลักการตรวจทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow Cyometry Crossmatching, FCXM) (29).....	25
ภาพที่ 13	แสดงหลักการของเทคนิค CDC เทียบกับ AHG-CDC และ FCXM (38).....	26
ภาพที่ 14	แสดงอัตราการตายของผู้ป่วย (Patient mortality) ที่เวลาต่าง ๆ แยกตามประเภทของการปลูกถ่ายไต (3) .....	36
ภาพที่ 15	สาเหตุของการเสียชีวิตของผู้รับไต แยกตามช่วงปีที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (3) .....	36
ภาพที่ 16	แสดงการแยก Mononuclear cells ด้วยน้ำยา Lymphoprep (Ficoll-hypaque; FH) (49).....	42
ภาพที่ 17	แสดงลักษณะขนาดของช่องนับเซลล์บน Hemocytometer .....	43
ภาพที่ 18	แสดงกราฟชนิดตอท-พล็อตจากเครื่องโฟลไซโตเมทรีขณะปรับตั้งค่าการตรวจวัด.....	50

ภาพที่ 19 ภาพแสดงกราฟการย้อมสีเซลล์ลิมโฟไซต์เพื่อแยกชนิดของเซลล์โดยเครื่องฟลูออไรโดเมทรี .....	51
ภาพที่ 20 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T cell ที่ใช้ Anti CD3 PE/Cy5 ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	52
ภาพที่ 21 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B cell ที่ใช้ Anti CD19 PE ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	53
ภาพที่ 22 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อม Anti Human IgG ที่ติดฉลากด้วย FITC .....	54



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไตเรื้อรัง (Chronic Kidney disease; CKD) เป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญในประเทศไทย และหลายประเทศทั่วโลก ผู้ป่วย CKD ในระยะยาวจะมีการดำเนินโรคไปสู่การเป็นโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (End stage renal disease; ESRD) ในที่สุดและยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของโลก (1) จากรายงานของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทยพบว่า แต่ละปีมีผู้ป่วยลงทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตเพิ่มขึ้น จนถึงปีค.ศ. 2018 มีจำนวนผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรอรับไตแล้ว 6,082 ราย (2) ซึ่งการรักษาโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ได้รับการยอมรับว่าดีและคุ้มค่าที่สุดในปัจจุบัน คือ การปลูกถ่ายไต หรือการนำไตที่สามารถทำงานได้ดีจากผู้บริจาคมาตัดปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยเพื่อใช้ทดแทนไตที่สูญเสียความสามารถในการทำงานไป เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตในปีค.ศ. 2018 จำนวนทั้งสิ้น 483 รายกับจำนวนผู้ป่วยรอรับการปลูกถ่าย พบว่าผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายคิดเป็นร้อยละ 7.8 ของผู้รอรับทั้งหมดเท่านั้น เป้าหมายของการปลูกถ่ายไต คือ เพื่อให้ผู้ป่วยหายจากโรค หรือ มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นใกล้เคียงปกติมากที่สุด ไตที่ทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยสามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์และใช้งานได้นาน ดังนั้นอุปสรรคสำคัญที่ต้องเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดขึ้น นั่นคือ การปฏิเสธอวัยวะ (Rejection) รวมถึงการสูญเสียกราฟท์ (Graft loss) จากรายงานทางสถิติของสมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย พบว่าสาเหตุหลักของการสูญเสียกราฟท์ ตั้งแต่ปีค.ศ. 2014-2017 คือ การปฏิเสธอวัยวะ คิดเป็นร้อยละ 41 ของการสูญเสียกราฟท์ทั้งหมด โดยในจำนวนนี้เป็นกรณีการปฏิเสธอวัยวะที่เกิดขึ้นในระยะ 6 เดือนแรกจำนวนร้อยละ 4.2 และปฏิเสธอวัยวะภายใน 1 ปีอีกร้อยละ 5.4 (3)

การปฏิเสธอวัยวะ (Rejection) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับต่อกราฟท์ หรืออวัยวะที่ปลูกถ่ายเข้าไปใหม่ โดยจำแนกชนิดของการปฏิเสธอวัยวะตามพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น และระยะเวลาในการเกิดหลังการปลูกถ่าย หากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมจะนำไปสู่การสูญเสียฟังก์ชัน และสูญเสียอวัยวะโดยเฉพะอย่างยิ่งในกลุ่มที่เกิดการปฏิเสธหลังปลูกถ่ายในระยะแรก ที่เรียกว่า Acute rejection ที่มีการศึกษาพบว่าปฏิกิริยาในกลุ่มนี้แม้จะสามารถรักษาได้ก่อนจะเกิดการสูญเสียอวัยวะไป แต่ก็ยังส่งผลต่อการอยู่รอดของอวัยวะในระยะยาว โดยพบว่ามีอัตราการอยู่รอดของอวัยวะต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เคยเกิดการปฏิเสธอวัยวะ และมักนำไปสู่การปฏิเสธไตแบบเรื้อรังในภายหลัง (4) กลไกการปฏิเสธอวัยวะเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันผู้รับสามารถรับรู้แอนติเจนของผู้ให้บนกราฟท์ แล้วเกิดการ

ตอบสนองต่อแอนติเจนที่ไม่ใช่ของตนเอง ส่งสัญญาณกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) มีการจับทำลายเซลล์ที่มีแอนติเจนแปลกปลอม รวมถึงมีการจดจำแอนติเจน และมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนชนิดนั้น โดยชนิดที่เป็นสาเหตุสำคัญในการปฏิเสธอวัยวะคือ Major Histocompatibility Complex (MHC) หรือเอชแอลเอแอนติเจน (Human Leukocyte Antigen, HLA) เป็นแอนติเจนที่พบได้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการนำเสนอแอนติเจนให้กับเซลล์ลิมโฟไซต์และเกี่ยวข้องกับการจดจำแอนติเจนที่ทำให้เกิดการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีการสัมผัสแอนติเจนเดิมซ้ำอีก ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยงในการปฏิเสธอวัยวะ จึงต้องมีการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (Histocompatibility Testing) ซึ่งเป็นการตรวจชนิดของแอนติเจนของผู้ให้และผู้รับ การตรวจแอนติบอดีในผู้ให้ และการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอระหว่างผู้ให้และผู้รับ (5, 6)

การตรวจความเข้ากันได้ (Crossmatch) คือการทดสอบเพื่อหาแอนติบอดีของผู้รับที่จำเพาะกับ แอนติเจนของผู้บริจาค เรียกว่า Donor Specific Antibody (DSA) การปลูกถ่ายไตในอดีตพบปัญหาและอุปสรรคจากการปฏิเสธอวัยวะเป็นจำนวนมาก จนกระทั่งในปีค.ศ. 1964 ที่ Terazaki P. และคณะนำเสนอการตรวจความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายไตด้วยโดยเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) ให้เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้ให้ทำปฏิกิริยากับ น้ำเหลืองของผู้รับแล้วพบความสัมพันธ์ระหว่างผลลบในการทดสอบความเข้ากันได้กับอัตราการความสำเร็จในการปลูกถ่ายไตมีมากกว่าผู้รับรายที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก หลักการของการทดสอบความเข้ากันได้โดยเทคนิค CDC-XM คือ ถ้าผู้รับมี DSA ในน้ำเหลือง จะทำปฏิกิริยาจับกับแอนติเจนบนเซลล์ได้เกิดเป็น Antigen-Antibody complex เมื่อเติมโปรตีนคอมพลีเมนต์ (Complement) ลงในปฏิกิริยาจะเกิดกระบวนการทำปฏิกิริยากับคอมพลีเมนต์ (Complement fixation) สร้าง Membrane Attack Complex (MAC) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูพรุน สารน้ำจากภายนอกจึงไหลเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ตาย ถึงแม้ว่าการทำ CDC-XM จะมีบทบาทสำคัญในการลดอัตราการเกิดการปฏิเสธอวัยวะลงได้ แต่เป็นเทคนิคที่มีความไว (Sensitivity) จำกัด ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีในปริมาณต่ำได้ ต่อมาจึงมีการพัฒนาเทคนิคให้มีความไวสูงขึ้นโดยการเติม Anti-Human Globulin ในปฏิกิริยา เรียกเทคนิคนี้ว่า Anti-Human Globulin Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (AHG-CDC) แต่ก็ยังไม่สามารถลดข้อจำกัดเดิมลงได้ทั้งหมด (7-11) ต่อมามีการนำเสนอเทคนิคใหม่ที่ได้รับการยอมรับว่าดีที่สุดจนถึงปัจจุบันคือเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry crossmatch, FCXM) มี หลักการคล้ายกับเทคนิค CDC-XM คือถ้าผู้รับมี DSA



ในน้ำเหลืองจะเกิดการจับกันกับแอนติเจนของผู้ให้ แต่ตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้แอนติบอดีต่อ Human Immunoglobulin G (IgG) ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ทำหน้าที่เป็น Secondary antibody ย้อมแอนติบอดีใน Antigen-Antibody complex และเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD marker (cluster of differentiation) บนผิวเซลล์และติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกันทำให้สามารถระบุชนิดของเซลล์ที่ทำการตรวจวัดได้ วัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer) ได้ค่าความเข้มข้นของสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent intensity, FI) ของแต่ละสี และนำค่า FI ที่ได้ไปแปลผล (12) การตรวจด้วยเทคนิคนี้เป็นการตรวจจับ Human IgG ที่จับกับแอนติเจนได้จึงทำให้ออกจากมีความไวเพียงพอจะตรวจจับแอนติบอดีในปริมาณต่ำ และยังมีประโยชน์ในการตรวจจับแอนติบอดีที่ไม่ต้องการคอมพลีเมนต์ (non complement fixing antibody) ด้วย แต่ความไวของเทคนิคทำให้มีรายงานการพบผลบวกปลอม รวมไปถึงการให้ผลบวกกับกลุ่มผู้รับที่มี DSA แต่เป็นแอนติบอดีในปริมาณต่ำและไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการปฏิเสธอวัยวะ ส่งผลให้ผู้รับอาจเสียโอกาสในการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาค ทำให้เทคนิค FCXM ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตเท่านั้น ไม่สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตัดสินใจปลูกถ่ายไตได้ ดังนั้นเพื่อลดผลบวกปลอม และทำให้ผลมีความถูกต้องเหมาะสมมากขึ้นจึงมีการปรับปรุงพัฒนาเทคนิค FCXM อย่างต่อเนื่อง (12, 13) สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ในประเทศไทยมีการให้บริการทั้งเทคนิค CDC-XM , AHG-CDC และ FCXM ที่เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปีค.ศ. 2005 โดย Kothathong K. และคณะรายงานผลการเปรียบเทียบความไวของเทคนิค CDC-XM, AHG-CDC, FCXM ที่ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยรอรับการปลูกถ่ายไตที่ตรวจพบว่ามีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอมากกว่าร้อยละ 15 และกลุ่มผู้ป่วยที่รอรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตมีชีวิต พบว่าเทคนิค FCXM มีความไวกว่า AHG-CDC 4-16 เท่า และไวกว่า CDC-XM 8-32 เท่า (14) ต่อมามีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ในผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตาย โดย Kupatawintu P. และคณะ ได้ศึกษาแบบข้อมูลย้อนหลัง กับผู้ที่ได้รับการปลูกถ่ายไตจำนวน 270 ราย พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างผล FCXM กับอัตราการอยู่รอดของไตที่อายุ 1 ปี แต่ก็พบปัญหาผลบวกปลอมถึงร้อยละ 35.9 เมื่อเทียบกับผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอเพื่อดู DSA ด้วยเทคนิค Solid phase immunoassays โดยใช้ Luminex® และเม็ดปัดส์ชนิด Single antigen beads (SABs) (15) ปัจจุบันในหลายห้องปฏิบัติการจึงยังคงใช้เทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC เป็นเทคนิคมาตรฐาน และพิจารณาร่วมกับผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอแทน

การทดสอบความเข้ากันได้ของผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตายของประเทศไทยในปัจจุบันใช้เทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ร่วมกับการตรวจสอบประวัติแอนติบอดีต่อเอชแอลเอเพื่อดู DSA โดยผลแอนติบอดีต่อเอชแอลเอเป็นผลจากการทดสอบด้วยเทคนิค Solid phase immunoassays โดยใช้ Luminex® และเม็ดปิดส์ชนิด Phenotype Panel system ทำให้พบผู้ป่วย Hyperacute rejection จากแอนติบอดีที่สร้างขึ้นก่อนปลูกถ่ายไต (Pre-existing antibodies) ค่อนข้างต่ำ แต่ยังมีข้อจำกัดของระยะเวลาการทดสอบความเข้ากันได้ที่ใช้เวลานาน และความจำเป็นต้องใช้เซลล์ลิมโฟไซต์จากต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามในการทดสอบ ทำให้บริหารจัดการมีความยุ่งยาก เช่นการตัดต่อมน้ำเหลืองเพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการ หรือการผ่าตัดนำไตออกมาเก็บรักษาและนำม้ามมาส่งห้องปฏิบัติการ และรอผลการทดสอบความเข้ากันได้ก่อนนำไปปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วย ส่งผลให้พบการทำงานของกราฟท์ช้า (Delay graft function; DGF) จากระยะเวลาการจัดเก็บรักษาไตที่อุณหภูมิต่ำยาว (Cold Ischemic Time, CIT) ดังนั้นเพื่อเป็นการยกระดับคุณภาพการตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อก่อนการปลูกถ่ายไตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและรวดเร็วขึ้น การศึกษานี้จึงต้องการปรับปรุงเทคนิคการตรวจ FCXM ให้ผลมีความสอดคล้องกับเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC และมีความถูกต้องแม่นยำ ลดอัตราการเกิดผลบวกปลอมเมื่อพิจารณาร่วมกับผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ เพื่อลดความเสี่ยงในการปฏิเสธอวัยวะในระยะต่างๆ รวมถึงประเมินผลเทคนิค FCXM ที่ปรับปรุงสำหรับการนำมาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทดแทนเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ได้ในผู้ป่วยรอรับไตจากผู้บริจาคไตสมองตาย โดยสามารถลดข้อจำกัดของเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ที่ต้องแยกทดสอบกับเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T-cell และ B-cell จึงต้องการเซลล์ที่ใช้ทดสอบจำนวนมาก และความมีชีวิตของเซลล์เพียงพอต่อการทดสอบ แต่เทคนิค FCXM จะทดสอบโดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งหมดได้ในครั้งเดียว จึงใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่าและสามารถทดสอบในเซลล์ที่มีความมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าเทคนิคเดิมได้ นอกจากนี้เทคนิค FCXM ที่ปรับปรุงแล้วยังอาจช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ทำให้สามารถตอบผลได้รวดเร็วขึ้นด้วย

## 2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อปรับปรุงเทคนิคการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry Crossmatching, FCXM) สำหรับการทดสอบในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย

2.2 เพื่อประเมินผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry Crossmatching, FCXM) ทดแทนเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) และ Anti-Human Globulin Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (AHG-CDC) ในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย

### 3. ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสโครงการ 14/2562 โดยทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค Flow cytometry crossmatch (FCXM) ในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการคัดเลือกให้ตรวจความเข้ากันได้ตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยของศูนย์รับบริจาคอวัยวะให้ทำการทดสอบความเข้ากันได้กับผู้บริจาคไตสมองตายด้วยเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) และ Anti-Human Globulin Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (AHG-CDC)

### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 สามารถนำเทคนิค Flow cytometry crossmatch (FCXM) ที่ปรับปรุงแล้วมาใช้ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต กับผู้บริจาค ทดแทนเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ได้

4.2 มีแนวทางในการเลือกวิธีและเทคนิคทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ ในผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายที่สามารถลดระยะเวลาการทดสอบ มีความถูกต้องแม่นยำ และสามารถปรับใช้งานในงานประจำได้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. การปลูกถ่ายไต (Kidney Transplantation)

การปลูกถ่ายไต คือ การผ่าตัดนำไตจากผู้อื่นที่ยังทำงานได้ดีมาให้กับผู้ป่วยเพื่อทดแทนไตเดิมที่สูญเสียความสามารถในการทำงานไปอย่างถาวรแล้ว เป็นหนึ่งในวิธีการบำบัดทดแทนไต (Renal replacement therapy) เพื่อรักษาผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะที่ 5 หรือไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (Chronic end stage kidney disease, ESRD) ซึ่งเป็นระยะที่รุนแรงที่สุด แบ่งระยะโดยใช้ค่าอัตราการกรองของไต (Estimated glomerular filtration rate, eGFR) ของผู้ป่วย (ตารางที่ 1) โดยในระยะที่ 1 และ 2 นั้นเป็นระยะที่แสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับไตเท่านั้นแต่ยังไม่ส่งผลต่อการทำงานของไต ทำให้ค่าอัตราการกรองเป็นปกติหรือผิดปกติเล็กน้อย เมื่อความเสียหายที่เกิดขึ้นกับไตมากขึ้นในระยะ 3 และ 4 จนกระทั่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของไต ค่า eGFR จะมีแนวโน้มลดลงและต่ำที่สุดในระยะที่ 5 จึงจำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไต โดยในปัจจุบันการปลูกถ่ายไตได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานและเป็นการรักษาที่ดีที่สุด เนื่องจากหลังการปลูกถ่ายไต เมื่อไตใหม่ทำหน้าที่ได้สมบูรณ์จะทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยใกล้เคียงคนปกติได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยวิธีฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (Hemodialysis) หรือ การล้างไตทางช่องท้อง (Peritoneal dialysis) (16-18)

#### ตารางที่ 1 ระยะของโรคไตเรื้อรัง (19)

ระยะของโรคไตเรื้อรัง (CKD stages)	eGFR (มล./นาที/1.73 ตร.ม.)	คำนิยามสำหรับค่าอัตราการกรองของไตสำหรับโรคไตแต่ละระยะ
ระยะที่ 1	มากกว่าหรือเท่ากับ 90	ค่าปกติ หรือ สูง
ระยะที่ 2	60-89	ลดลงกว่าปกติเล็กน้อย
ระยะที่ 3a	45-59	ลดลงกว่าปกติเล็กน้อย - ปานกลาง
ระยะที่ 3b	30-44	ลดลงกว่าปกติปานกลาง - มาก
ระยะที่ 4	15-29	ลดลงกว่าปกติมาก
ระยะที่ 5	น้อยกว่า 15	ไตวายระยะสุดท้าย

## 2.งานปลูกถ่ายไตในประเทศไทย

ประเทศไทยเริ่มมีการปลูกถ่ายไตสำเร็จเป็นครั้งแรกที่คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในปี พ.ศ. 2515 แต่เนื่องจากการผ่าตัดเพื่อปลูกถ่ายอวัยวะยังเป็นเรื่องใหม่ ทำให้ยังไม่แพร่หลายไปยังสถาบันต่างๆ มากนัก จนถึงปี พ.ศ.2530 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้รายงานความสำเร็จในการทำปลูกถ่ายตับ (Liver Transplantation) ในมนุษย์เป็นครั้งแรกในประเทศไทยและในปีเดียวกันก็สามารถทำปลูกถ่ายหัวใจ (Heart Transplantation) สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและเป็นครั้งแรกในทวีปเอเชียด้วย ทำให้การปลูกถ่ายอวัยวะเป็นที่สนใจและได้รับการสนับสนุนมากขึ้น มีการปลูกถ่ายไตเพิ่มขึ้นในโรงพยาบาลต่างๆ จนกระทั่งในปี พ.ศ.2537 จึงได้มีการจัดตั้งศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทยพร้อมคณะกรรมการอำนวยการ เพื่อเป็นศูนย์กลางในการประสานงานระหว่างสถาบันต่างๆ ดำเนินการดูแลงานปลูกถ่ายอวัยวะโดยเฉพาะการปลูกถ่ายอวัยวะจากผู้บริจาคสมองตาย รวมถึงให้ความรู้เกี่ยวกับงานปลูกถ่ายอวัยวะ จนถึงปัจจุบันมีสถาบันที่สามารถทำการปลูกถ่ายไตและอวัยวะอื่นๆ ได้มากกว่า 20 แห่งทั่วประเทศ (2, 16, 17)

### 2.1 ผู้บริจาคไต (Donor)

ไตที่สามารถนำมาปลูกถ่ายให้ผู้ป่วยได้ จะมาจากผู้บริจาคที่มีความประสงค์ต้องการบริจาคไต มีสุขภาพดี ไตสามารถทำงานได้เป็นปกติ ไม่เป็นโรคมะเร็งในระยะลุกลาม ไม่มีภาวะติดเชื้อที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้รับอวัยวะ หรือโรคอื่นๆ ตามประกาศ และต้องดำเนินการตามข้อบังคับแพทยสภาว่าด้วยการรักษาจริยธรรมแห่งวิชาชีพเวชกรรม(ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2560 โดยแบ่งผู้บริจาคได้เป็น 2 กลุ่มคือ

**2.1.1 ผู้บริจาคไตมีชีวิต (Living Donor)** คือ ผู้บริจาคที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง แสดงความประสงค์บริจาคอวัยวะขณะยังมีชีวิตโดยระบุผู้รับไต และมีข้อกำหนดดังนี้

- ผู้บริจาคและผู้รับต้องมีความสัมพันธ์ทางสายโลหิต หรือมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สามารถ พิสูจน์ได้ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น เอชแอลเอ (HLA) และ/หรือดีเอ็นเอ (DNA) หรือ
- ผู้บริจาคต้องเป็นสามีภรรยาโดยชอบด้วยกฎหมายมาแล้วอย่างน้อยสามปี หรืออยู่กินฉันสามีภรรยาโดยเปิดเผยกับผู้รับอวัยวะมาแล้วอย่างน้อยสามปี กรณีที่มีบุตรร่วมกันโดยสายโลหิต ไม่ต้องใช้ระยะเวลาสามปี หากมีปัญหาในการพิสูจน์บุตรร่วมกันให้ใช้เอชแอลเอและ/หรือดีเอ็นเอ เป็นเครื่องพิสูจน์ (19)

**2.1.2 ผู้บริจาคไตสมองตาย (Deceased Donor)** คือ ผู้บริจาคไตที่ได้รับการประเมินและตรวจยืนยันว่าสมองตายซึ่งในทางกฎหมายและทางการแพทย์ถือว่าเสียชีวิตแล้ว แต่ไตยัง

สามารถทำงานได้ดี โดยได้รับความยินยอมจากญาติเพื่อทำการบริจาค ปัจจุบันดำเนินการบริจาคไตผ่านศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทยเท่านั้น และศูนย์จะทำการจัดสรรให้กับผู้ป่วยรอรับไตที่เหมาะสมต่อไป (16)

## 2.2 ผู้รับไต หรือ ผู้ป่วยรอรับการปลูกถ่ายไต (Recipient)

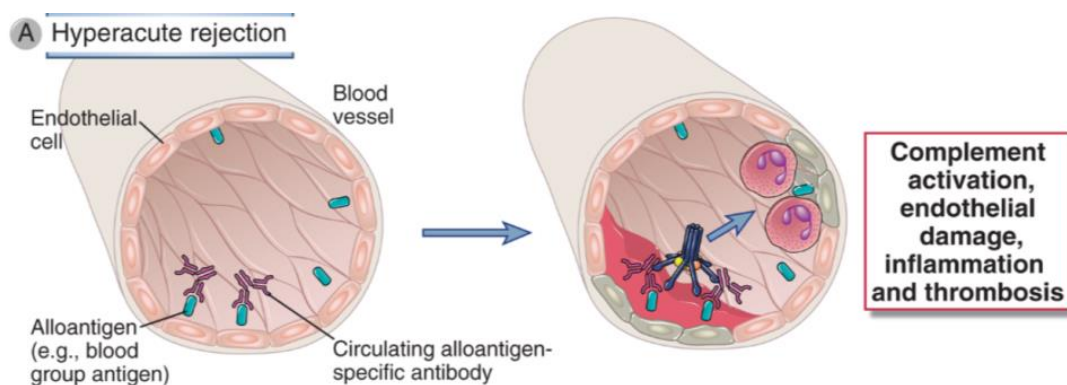
ผู้รับไต หรือ ผู้ป่วยรอรับการปลูกถ่ายไต คือผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย และอยู่ในระหว่างการรักษาด้วยการบำบัดแทนไต โดยวิธีล้างช่องท้องด้วยน้ำยา (Peritoneal Dialysis) หรือการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (Hemodialysis) เข้ารับการปลูกถ่ายไตกับผู้บริจาคไตมีชีวิต หรือลงทะเบียนเป็นผู้รอรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายผ่านโรงพยาบาลสมาชิกของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย ที่สามารถทำการปลูกถ่ายไตได้ โดยผู้รับต้องมีความพร้อมในการทำผ่าตัด ไม่มีภาวะติดเชื้อ ภาวะความเสี่ยงสูงต่อการผ่าตัดหรือโรคเรื้อรังต่างๆ และไม่เป็นผู้ติดยาเสพติด (19)

## 3 การปฏิเสธอวัยวะ (Rejection)

การปฏิเสธอวัยวะหรือการสลัดกราฟท์ คือ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ได้รับมา (Allogeneic graft) ทำให้กราฟท์ได้รับความเสียหาย หรือถูกทำลายนำไปสู่การสูญเสียการทำงานของกราฟท์หรือต้องนำกราฟท์นั้นออกในที่สุด มักจำแนกชนิดตามลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (histopathology) ที่เกิดขึ้นและระยะเวลาที่เริ่มเกิดพยาธิสภาพหลังการปลูกถ่าย สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม(5, 20, 21) คือ

**3.1 Hyperacute rejection** คือการปฏิเสธอวัยวะที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลารวดเร็ว พบได้ตั้งแต่ภายในไม่กี่นาทีไปจนถึงภายในระยะเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมงหลังการปลูกถ่าย มีลักษณะพยาธิสภาพที่สำคัญคือ มีการเกิดลิ่มเลือด (Thrombotic occlusion) ภายในอวัยวะที่ปลูกถ่าย มีสาเหตุจากแอนติบอดีที่สร้างขึ้นก่อนปลูกถ่ายไต (Pre-existing antibodies) ที่เกิดจากการได้รับเอชแอลเอแอนติเจนมาก่อน เช่น จากการรับเลือด การตั้งครรภ์รวมถึงการปลูกถ่ายอวัยวะครั้งก่อนหน้า ซึ่งเป็นแอนติบอดีของผู้รับที่จำเพาะกับผู้ให้กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ ทำให้เกิดการอักเสบ นำไปสู่ความเสียหายของเซลล์เนื้อเยื่อ (Endothelial cells) และมีการแสดงออกของโปรตีนที่อยู่ติดกับเยื่อรองรับฐานของเซลล์เนื้อเยื่อชั้นล่าง (Sub-endothelial basement membrane protein) กระตุ้นเกล็ดเลือดให้จับตัวกัน รวมถึงมีการหลังปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (Coagulation factors) ทำให้เกิดลิ่มเลือดภายในเส้นเลือดของอวัยวะและอุดตันในที่สุด (ภาพที่ 1) อวัยวะที่ปลูกถ่ายไปจึงขาดเลือดและ

เกิดความเสียหายจากการขาดเลือดแบบถาวร (Irreversible ischemic damage) จนเป็นผลให้เซลล์ตาย บางครั้งแอนติบอดีในร่างกายผู้รับมีปริมาณไม่มาก การปฏิเสธอวัยวะอาจค่อยๆ ดำเนินไปอย่างช้าๆ แต่ไม่ใช้เวลานาน เช่น ประมาณ 3-5 วันหลังการปลูกถ่าย กลุ่มนี้อาจเรียกว่า Accelerated rejection (5, 20, 21)



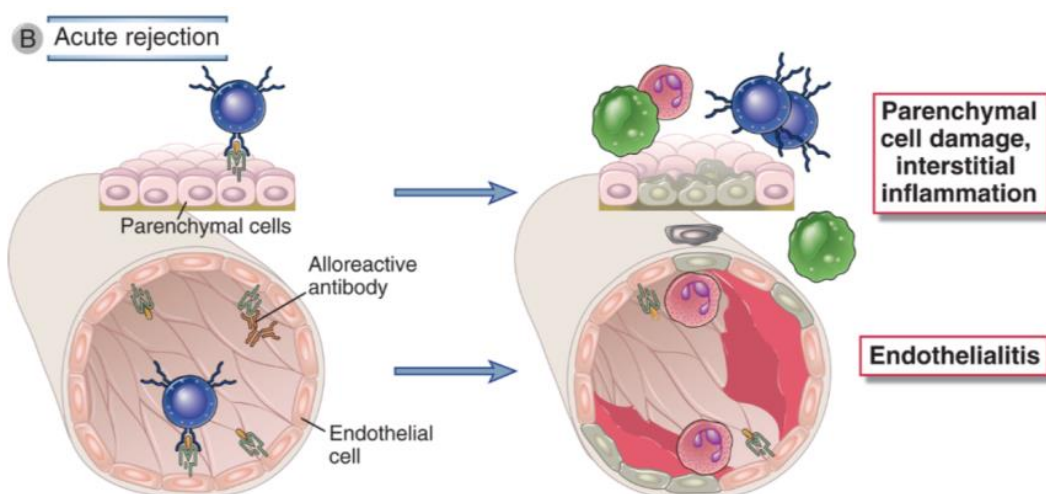
ภาพที่ 1 แสดงการเกิด Hyperacute rejection จากภายในเส้นเลือดของกราฟท์ (5)

**3.2 Acute rejection** คือ การปฏิเสธอวัยวะที่เกิดขึ้นหลังทำการปลูกถ่ายประมาณ 6 – 90 วัน มีพยาธิสภาพคือเกิดความเสียหายที่เซลล์เนื้อของอวัยวะ (Parenchymal cell) และเส้นเลือดภายในอวัยวะ จากการตอบสนองของ T cell ที่ถูกกระตุ้นและแอนติบอดีที่สร้างขึ้นใหม่ (ภาพที่ 2) โดยการตอบสนองของ T cell ตั้งแต่รับรู้แอนติเจนจากการนำเสนอของ APCs จนกระทั่งเกิดการอักเสบ สามารถสร้างความเสียหายให้กับเซลล์กราฟท์ที่ต้องอาศัยระยะเวลาช่วงหนึ่ง โดยแบ่งตามกลไกการตอบสนองได้อีก 2 รูปแบบ (5, 20, 21) คือ

**3.2.1 Acute cellular rejection** เป็นกลุ่มที่เกิดจากการตอบสนองแบบ CTL-mediated cell lysis มีการพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยต์ ในเนื้อเยื่อและมีการทำลายส่วนต่างๆ ของกราฟท์ โดยเฉพาะเซลล์เนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมายหลักในการจับทำลาย มักพบการอักเสบของเซลล์เนื้อเยื่อที่หลอดเลือดขนาดเล็ก (Microvascular endothelialitis) ในระยะแรกของการปฏิเสธอวัยวะ และจะพัฒนาความรุนแรงมากขึ้นหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม (5, 20, 21)

**3.2.2 Acute Antibody-Mediated Rejection (AMR)** คือการเกิดการปฏิเสธอวัยวะที่มีสาเหตุจากแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้น (Alloantibodies) จับกับแอนติเจนแปลกปลอม (Alloantigens) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของโมเลกุลเอชแอลเอที่อยู่บนเซลล์เนื้อเยื่อ ก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์และเกิดลิ่มเลือดภายในหลอดเลือด (Intravascular thrombosis) ส่งผลให้อวัยวะ

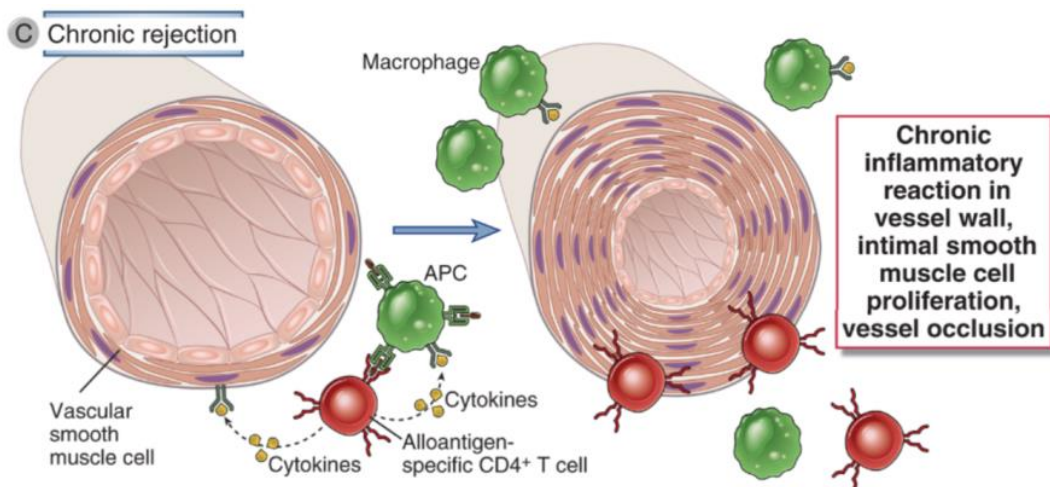
ถูกทำลายในที่สุด เนื่องจากแอนติบอดีที่จับกับเซลล์จะทำให้เกิดการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์นำไปสู่การทำให้เซลล์แตก (Lysis) รวมถึงทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ และการสร้างลิมโฟไซต์ นอกจากนี้การที่แอนติบอดีโจมตีเซลล์เนื้อเยื่อโดยตรงยังเป็นการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของสารก่อการอักเสบ (Proinflammatory protein) มากขึ้น ทำให้พบการตาย (Necrosis) ของเซลล์บริเวณผนังเส้นเลือดภายในอวัยวะแตกต่างจากการเกิดลิมโฟไซต์อุดตันใน Hyperacute rejection (5, 20, 21)



ภาพที่ 2 แสดงการเกิด Acute rejection จากเส้นเลือดภายในกราฟท์ (5)

**3.3 Chronic rejection** คือ การปฏิเสธอวัยวะที่เกิดขึ้นหลังปลูกถ่ายตั้งแต่ 90 วัน หรือ 3 เดือนขึ้นไป โดยจะค่อยๆ พัฒนาการเกิดพยาธิสภาพของอวัยวะ แตกต่างจากการปฏิเสธอวัยวะแบบเฉียบพลัน มักพบความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดภายในอวัยวะ คือมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้น เรียกว่า Vasculopathy หรือ Accelerated graft arteriosclerosis ซึ่งนำไปสู่ภาวะอวัยวะขาดเลือด (ภาพที่ 3) สาเหตุการเกิด rejection กลุ่มนี้ยังไม่แน่ชัด แต่เชื่อว่าเกิดจากหลายกลไกร่วมกัน (5, 20, 21)





ภาพที่ 3 แสดงการเกิด Chronic rejection จากเส้นเลือดภายในกราฟท์ (5)

#### 4 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อการปลูกถ่ายไตและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง

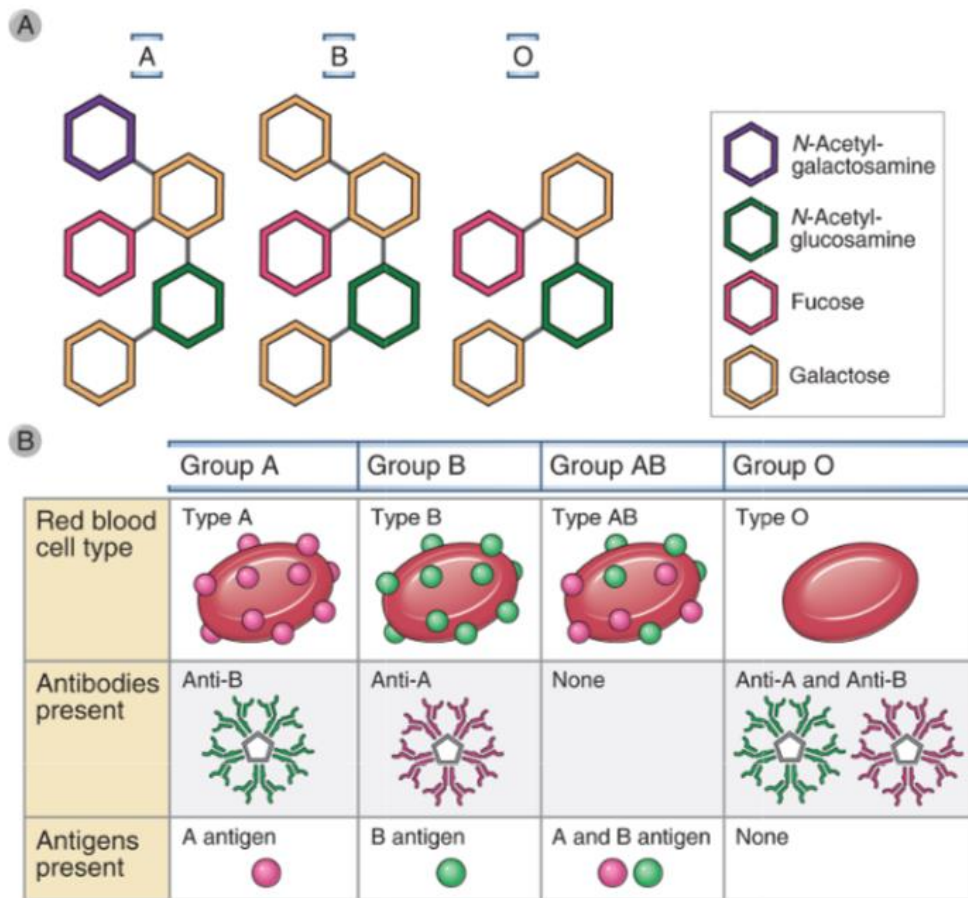
ในธรรมชาติร่างกายมนุษย์มีระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system) ทำหน้าที่ป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก (Foreign antigen หรือ invader) รวมถึงเซลล์ของร่างกายที่มีความผิดปกติ อาทิเช่น เซลล์มะเร็ง โดยระบบจะสามารถจำแนกเซลล์ของตนเองและไม่ใช้ของตนเองได้ สำหรับการปลูกถ่ายไต คือการนำเนื้อเยื่อ หรือเรียกแทนว่า กราฟท์ (graft) ของผู้ให้ไปใส่ให้กับผู้รับ จึงสามารถเกิดกระตุ้นให้มีการต่อต้านเนื้อเยื่อแปลกปลอมจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้รับ เกิดเป็นการสลายกราฟท์ หรือ การปฏิเสธอวัยวะ ซึ่งเป็นอุปสรรคหลักในการปลูกถ่ายอวัยวะ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการก่อนเพื่อพิจารณาความเข้ากันได้ระหว่างเนื้อเยื่อของผู้ให้กับผู้รับและเป็นข้อมูลในการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อต้านอวัยวะ ใช้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเนื้อเยื่อแปลกปลอม และกลไกการตอบสนองต่อยากดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive) เป็นแนวทางในการเตรียมผู้รับอวัยวะ ตลอดจนการดูแลหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ นอกจากนี้การปลูกถ่ายอวัยวะเป็นเหตุการณ์ที่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ การเกิดปฏิกิริยาตอบสนองนี้จึงสามารถใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่ดีมากอีกทางหนึ่ง(5, 17, 21, 22)

การทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะหรือการตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (Histocompatibility Test) เป็นการทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อแปลกปลอม โดยทำการตรวจทั้งในผู้ให้และผู้รับ มีการทดสอบเพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่มีการสร้างไว้ก่อนแล้วของผู้รับ (preexisting antibody) และจำเพาะกับ

แอนติเจนของผู้ให้ (DSA) รวมถึงมีการทดสอบความเข้ากันได้ (crossmatch) ระหว่างผู้ให้กับผู้รับด้วย โดยสำหรับผู้ให้และผู้รับที่จะทำการปลูกถ่ายไต จะมีการทดสอบสำคัญก่อนการปลูกถ่ายไต ดังนี้

#### 4.1 การตรวจหมู่เลือดเอบีโอ (ABO Blood Group Testing)

แอนติเจนของหมู่เลือดเอบีโอ (ABO) มีโครงสร้างเป็นสายคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของแอนติเจน (ภาพที่ 4A) พบได้บนผิวของเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว เซลล์เนื้อเยื่อ ผิวหนัง เยื่อบุอวัยวะ รวมไปถึงสารคัดหลั่งด้วย หมู่เลือดในระบบเอบีโอ ถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 เมื่อร่างกายสร้างแอนติเจนชนิดใดก็ จะไม่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้น แต่จะมีการสร้างแอนติบอดีโดยธรรมชาติต่อแอนติเจนชนิดอื่นในระบบแทน (ภาพที่ 4B) เช่น ผู้ที่มีหมู่เลือดเอ มีแอนติเจนเอ จะพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนบี (anti-B) ดังนั้นในการปลูกถ่ายไต จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงความเข้ากันได้ (Compatibility) ระหว่างหมู่เลือดในระบบเอบีโอของผู้ให้และผู้รับเสมอ เนื่องจากไตหรือกราฟท์ที่นำไปปลูกถ่ายจะมีการแสดงออกของแอนติเจนเอบีโอบนผิวเซลล์ หากทำการปลูกถ่ายไตจากผู้ให้กับผู้รับที่มีแอนติเจนและแอนติบอดีตรงกันจะทำให้แอนติบอดีของผู้รับเข้าจับจำเพาะกับแอนติเจนในกราฟท์ เกิดการทำลายเส้นเลือดภายในไต พร้อมทั้งมีการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดและการทำงานของโปรตีนคอมพลีเมนต์ก่อให้เกิดการปฏิเสธอวัยวะอย่างรวดเร็ว (5, 20, 21, 23)



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของแอนติเจนของระบบเอบีโอบนผิวเม็ดเลือดแดง

A) แสดงโครงสร้างสายคาร์โบไฮเดรตของแอนติเจนเอบีโอ

B) แสดงชนิดของแอนติเจนเอบีโอและแอนติบอดีของแต่ละหมู่เลือด (5)

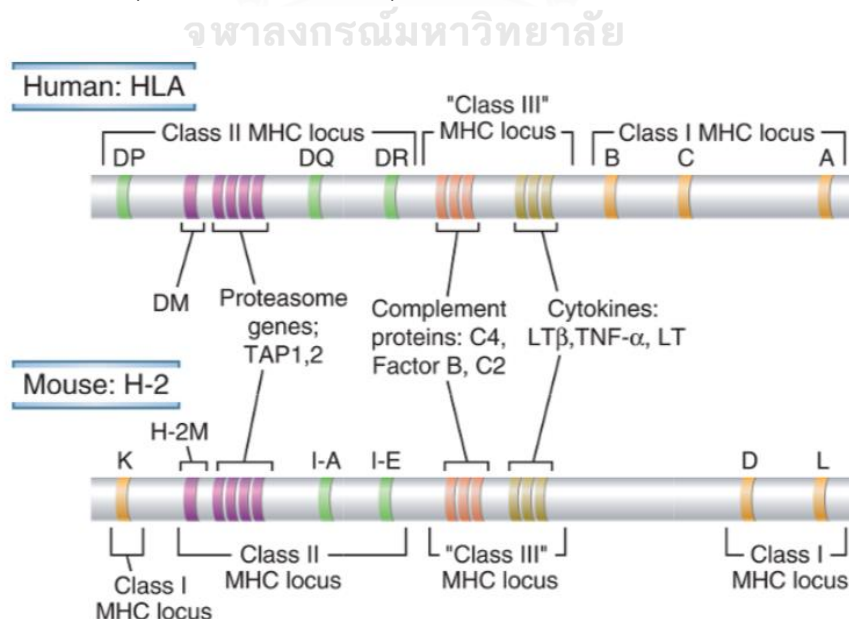
การตรวจหมู่เลือดในระบบเอบีโอ จะทำการตรวจหมู่เลือดของผู้ให้และผู้รับ สำหรับในผู้ป่วยปลูกถ่ายไตโดยปกติจะต้องมีหมู่เลือดเข้ากันได้กับผู้ให้เท่านั้นดังแสดงในตารางที่ 2 กรณีที่ผู้ให้และผู้รับหมู่เลือดไม่สามารถเข้ากันได้ สำหรับการรับไตจากผู้บริจาคไตมีชีวิต จะมีกระบวนการเตรียมผู้รับที่แตกต่างจากปกติ เช่น การให้สารน้ำทดแทนพลาสมา (plasma exchange) เพื่อลดความเข้มข้นของแอนติบอดีในผู้รับ ส่วนกลุ่มผู้รับไตจากผู้บริจาคไตสมองตายจะมีการคัดเลือกผู้รับไตให้มีหมู่เลือดเข้ากันได้กับผู้รับเท่านั้น ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดการปฏิเสธอวัยวะเนื่องจากปฏิกิริยาจากการจับกันของแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระบบหมู่เลือดเอบีโอ

ตารางที่ 2 แสดงหมู่เลือดระบบเอบีโอที่เข้ากันได้ระหว่างผู้บริจาคและผู้รับอวัยวะ(24)

Recipient	Donor			
	A	B	AB	O
A	✓	X	X	✓
B	X	✓	X	✓
AB	✓	✓	✓	✓
O	X	X	X	✓

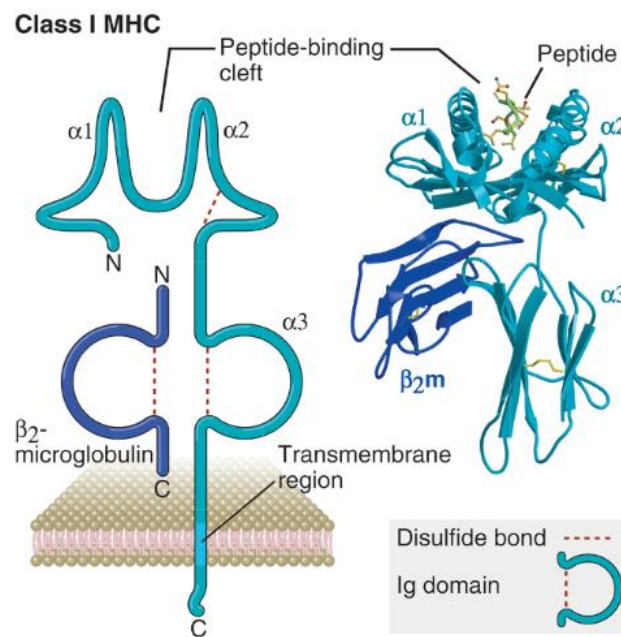
#### 4.2 การตรวจหาชนิดของแอนติเจนเอชแอลเอ (HLA Typing)

Major Histocompatibility Complex (MHC) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่าแอนติเจนเอชแอลเอ (Human Leukocyte Antigen, HLA) เป็นไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่พบบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวและเนื้อเยื่อต่างๆ ในมนุษย์ ควบคุมโดยกลุ่มยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 6 ค้นพบครั้งแรกจากการศึกษาการปฏิเสธกราฟท์ในการปลูกถ่ายผิวหนังในหนู ซึ่ง MHC ที่พบในหนูจะเรียกอีกชื่อหนึ่ง คือ H-2 complex (ภาพที่ 5) แอนติเจนเอชแอลเอประกอบด้วยยีนหลายโลคัส (locus) และแต่ละโลคัสมีได้หลายแอลลีล (allele) ทำให้กลุ่มของแอนติเจนเอชแอลเอในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกันสูง หรือมีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) แบ่งชนิดของแอนติเจนเอชแอลเอตามโครงสร้าง และการกระจายภายในเซลล์ (cellular distribution) ได้เป็น 2 ชนิด คือ



ภาพที่ 5 แสดงองค์ประกอบของกลุ่มยีนควบคุม HLA ในมนุษย์เทียบกับ H-2 ในหนู (5)

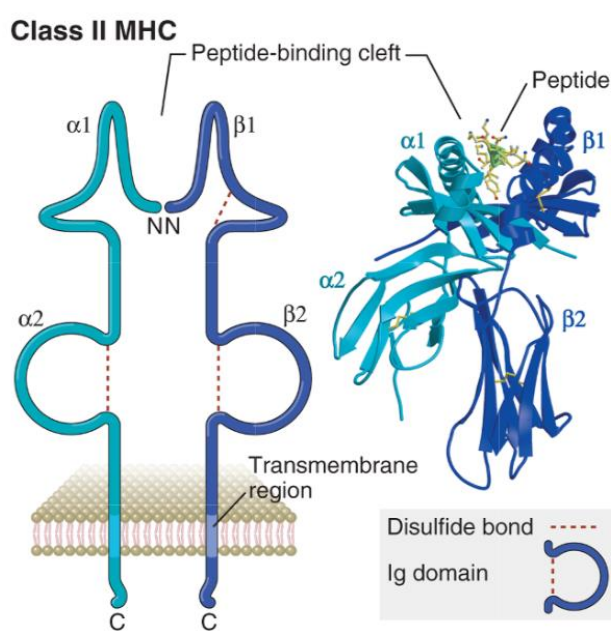
4.2.1 แอนติเจนเอชแอลเอ Class I ประกอบด้วยยีน 3 โลคัสที่สำคัญ คือ HLA-A, B และ C มีการแสดงออก (Express) บนผิวเซลล์ทุกชนิดที่มีนิวเคลียส พบมากที่สุดบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เป็นแอนติเจนที่ใช้จำแนกระหว่างตัวเองและสิ่งแปลกปลอม มีหน้าที่สำคัญคือนำเสนอแอนติเจนต่อ  $CD8^+$  T cell หรือ Cytotoxic T lymphocyte (CTL) โดยเป็นแอนติเจนที่สร้างจากภายในเซลล์ (endogenous antigen) โครงสร้างสำคัญของโมเลกุลประกอบด้วยโกลโคโปรตีน 2 สายคือ  $\alpha$  chain (Heavy chain) ส่วนอีกสายหนึ่งคือ  $\beta_2$ -microglobulin (light chain) ซึ่งถอดรหัส (encode) มาจากยีนนอก MHC ส่วนที่ทำหน้าที่ในการนำเสนอชิ้นส่วนแอนติเจนที่เหมาะสมให้กับ T cell คือบริเวณ Peptide-binding cleft ระหว่าง  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$  (ภาพที่ 6) ส่วน  $\alpha 3$  จะจับกับโมเลกุล  $CD8^+$  บนผิว T cells (5, 6, 25, 26)



ภาพที่ 6 ภาพ 3 มิติโดยวิธี X-ray crystallography ของโครงสร้างโมเลกุล HLA Class I (5)

4.2.2 แอนติเจนเอชแอลเอ Class II: ประกอบด้วย 3 โลคัส คือ HLA-DR, DQ และ DP พบว่ามีการแสดงออกบนผิวเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการนำเสนอแอนติเจน ให้กับ T-helper หรือ  $CD4^+$  T cells คือพบบนผิวของเซลล์ในกลุ่ม Antigen presenting cells (APCs) ได้แก่ Macrophage, B lymphocytes, dendritic cells แต่จะไม่พบบนผิวของ T cells และเกล็ดเลือด มีหน้าที่สำคัญคือ นำเสนอแอนติเจนต่อ  $CD4^+$  T cell หรือ T-helper ซึ่งแอนติเจนที่นำเสนอจะเป็นกลุ่มที่นำเข้ามาจากภายนอกเซลล์ (Exogenous หรือ Extracellular antigen) และเมื่อนำเข้าเซลล์

APCs จะเข้าสู่กระบวนการย่อยเป็นชิ้นเล็ก (Endocytosis) ก่อนนำแอนติเจนไปนำเสนอ โครงสร้างสำคัญประกอบด้วยโปรตีน 2 สาย คือ  $\alpha$  และ  $\beta$  chain มีส่วนประกอบที่อยู่ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ แบ่งเป็น 3 ส่วน มี Peptide-binding cleft ระหว่าง  $\alpha 1$  และ  $\beta 1$  เป็นบริเวณที่นำเสนอ Antigen ให้กับ T-helper (ภาพที่ 7) คล้ายกับ HLA Class I แต่ทั้ง 2 สายจะถอดรหัสจากยีน MHC (5, 6, 25, 26)



ภาพที่ 7 ภาพ 3 มิติโดยวิธี X-ray crystallography ของโครงสร้างโมเลกุล HLA Class II (5)

การตรวจระบุชนิดของแอนติเจนเอชแอลเอจะทำการตรวจทั้งของผู้ให้และผู้รับ เพื่อนำผลมาพิจารณาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแอนติเจนเอชแอลเอของผู้ให้และผู้รับ (HLA Antigen Mismatch, MM) โดยตรวจทั้ง 2 ชนิดคือแอนติเจนเอชแอลเอ Class I และ Class II แต่เลือกนำไปพิจารณาเฉพาะ HLA-A และ B ในแอนติเจนเอชแอลเอ Class I เนื่องจากมีภาวะพหุสัณฐานมากกว่า โลกส์อื่นโดยเฉพาะ HLA-B และเลือก HLA-DR ในแอนติเจนเอชแอลเอ Class II เนื่องจากเป็นโลกส์ที่มีแอนติเจนในปริมาณมากและพบได้บนผิวเซลล์ได้หลายชนิดกว่าโลกส์อื่น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่ากลุ่มผู้รับการปลูกถ่ายไตที่แอนติเจนเอชแอลเอทั้ง 3 โลกส์ไม่แตกต่างกับผู้ให้หรือเรียกว่า zero mismatch มีอัตราการรอดของไต (graft survival) นานกว่ากลุ่มที่แอนติเจนมีความแตกต่างประมาณร้อยละ 20 (27) โดยในการปลูกถ่ายไตจำนวนตำแหน่งของแอนติเจนเอชแอลเอที่แตกต่างกัน จะไม่มีผลเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไต แต่มีการนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของการให้คะแนนตามเกณฑ์

เพื่อพิจารณาคัดเลือกผู้รับอวัยวะจากผู้บริจาคไตสมองตายเท่านั้น โดยพิจารณาให้คะแนนเรียงลำดับจากผู้รับที่มีจำนวนแอนติเจนที่แตกต่างกับผู้ให้น้อยที่สุดก่อน เนื่องจากความแตกต่างของแอนติเจนเอชแอลจะส่งผลต่อโอกาสในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนแปลกปลอมในระยะยาว และอาจนำไปสู่การปฏิเสธกราฟท์ หรือทำให้กราฟท์มีอัตราการรอดต่ำลงได้

ในปัจจุบันการตรวจระบุชนิดของแอนติเจนเอชแอลสามารถทำได้หลายวิธี ที่นิยมมากคือการนำวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology technique) มาใช้ เนื่องจากสามารถระบุชนิดของแอนติเจนเอชแอลได้ถูกต้อง ความละเอียดเพียงพอต่อการแปลผลเพื่อการปลูกถ่ายอวัยวะ คือสามารถระบุได้ถึงระดับแอลลิล ซึ่งมีความละเอียดกว่าเทคนิคทางซีโรโลยีโดยเทคนิค CDC ที่สามารถระบุได้ถึงระดับแอนติเจนเท่านั้น อีกทั้งการตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยายังใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิคทางซีโรโลยี โดยเทคนิคที่ห้องปฏิบัติการต่างๆ นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ Polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO), polymerase chain reaction - sequence-specific primers (PCR-SSP) และ *real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR)* (5, 20-22, 24)

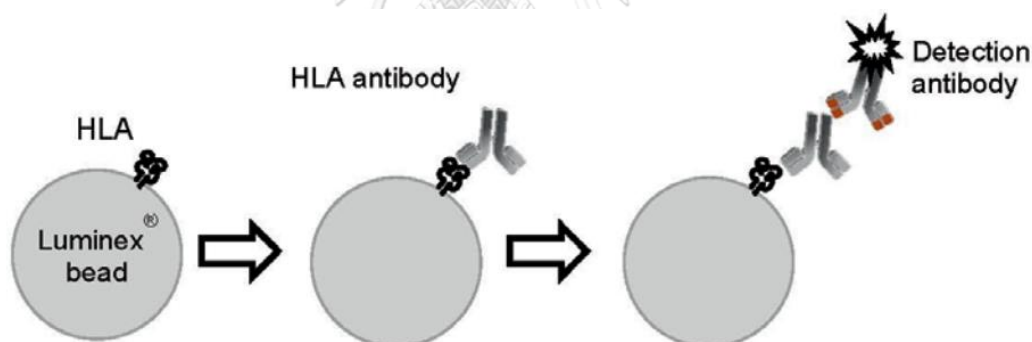
### 4.3 การตรวจหาแอนติบอดี

การตรวจหาแอนติบอดี เป็นการตรวจในผู้รับ โดยตรวจหาและระบุชนิดของแอนติบอดีที่มีการสร้างไว้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะและยังอยู่ในกระแสเลือด โดยปกติสำหรับการปลูกถ่ายอวัยวะจะเน้นการตรวจแอนติบอดีในกลุ่มที่จำเพาะต่อแอนติเจนเอชแอล เนื่องจากแอนติบอดีต่อเอชแอลเป็นสาเหตุสำคัญที่การก่อให้เกิดปฏิกิริยาการปฏิเสธอวัยวะ ส่วนแอนติบอดีชนิดอื่นหรือ Non-HLA antibody ปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดในการตรวจที่แน่นอน ชนิดของแอนติบอดีในกลุ่มนี้ที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการปลูกถ่ายไตยังไม่ทราบชัดเจน ดังนั้นจึงมีการตรวจบางชนิดเท่านั้น เช่น Anti-endothelial cell antibodies, Anti-MHC Class-I related chain A (MICA) antibodies, Angiotensin II type 1 receptor antibodies (AT1R) เป็นต้น การตรวจหาและระบุชนิดของแอนติบอดีต่อเอชแอลมีหลายเทคนิคที่มีหลักการในการตรวจแตกต่างกัน ที่นิยมใช้มี 2 เทคนิคดังนี้

**4.3.1 เทคนิค Complement dependent cytotoxicity (CDC)** เป็นเทคนิคทางซีโรโลยี ที่ใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีแอนติเจนเอชแอลแตกต่างกันจำนวน 20-40 รายทำการทดสอบกับน้ำเหลือง (serum) ที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดี นำจำนวนเซลล์ทดสอบที่ให้ผลบวกมาคำนวณจาก

เซลล์ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบเป็นค่าร้อยละและรายงานเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ Panel Reactive Antibody (PRA)

**4.3.2 เทคนิค Solid phase immunoassays โดยใช้ Luminex®** เป็นเทคนิคมาตรฐานและได้รับความนิยมมากในปัจจุบันใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด Immunoglobulin G (IgG) ได้ดี มีหลักการคือ ตรวจวัดสีฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent) ที่เกิดขึ้นบนเม็ดบีดส์ (Polystyrene microbeads) ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะเคลือบด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ 2 สีเพื่อใช้ระบุหมายเลขของบีดส์ที่ใช้ในชุดทดสอบและมีแอนติเจนเอชแอลเอ (Purified HLA Antigens) หรือแอนติเจนเอชแอลเอสังเคราะห์ (recombinant protein) อยู่บนผิวของเม็ดบีดส์ ในกรณีที่น้ำเหลืองมีแอนติบอดีจำเพาะกับ แอนติเจนเอชแอลเอจะเกิดปฏิกิริยาจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่อเติม Secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนซ์ลงไปจะเกิดการจับตัวกันกับแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ (antigen-antibody complex) ตรวจวัดและรายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยความเข้มของสีฟลูออเรสเซนซ์ (mean fluorescence intensity, MFI) ที่วัดได้ (ภาพที่ 8) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แต่ความไวจะขึ้นอยู่กับชนิดของบีดส์ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งแบ่งชนิดตามองค์ประกอบของแอนติเจนบนบีดส์ (Beads) ได้ 3 ชนิด (ภาพที่ 9) คือ (28)



ภาพที่ 8 แสดงหลักการของการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Luminex® (28)

**4.3.2.1 Pool antigen system หรือ Screening beads** คือบีดส์ที่มี HLA แอนติเจนหลายชนิดเคลือบอยู่ โดยจะเป็นแอนติเจนที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงหลายเซลล์รวมกันทำให้มีความหลากหลายของแอนติเจนในชุดทดสอบจำนวนมาก การตรวจด้วยบีดส์ชนิดนี้มักใช้ในการตรวจคัดกรอง (Screening) แอนติบอดีต่อแอนติเจนเอชแอลเอและบางผลิตภัณฑ์สามารถตรวจจับ แอนติบอดีต่อแอนติเจนมิกาเอ (MICA) ซึ่งอยู่ในกลุ่มแอนติบอดีต่อแอนติเจนอื่น (non-HLA antibodies) ได้

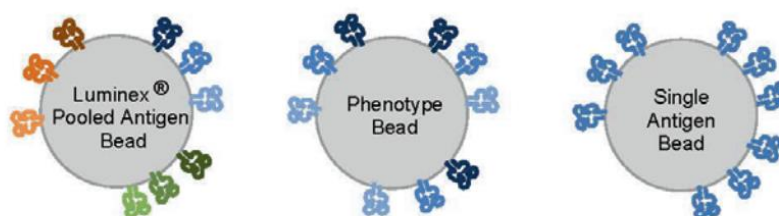
**4.3.2.2 Phenotype Panel system** หรือ บีดส์สำหรับการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอที่สามารถคำนวณค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่อเซลล์หรือเม็ด



ปัดส์ที่ทดสอบทั้งหมดได้ (Panel Reactive Antibody, PRA) โดยบนปัดส์แต่ละเม็ด มีการเคลือบด้วยแอนติเจนเอชแอลเอจากเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์เดียว ทำให้แอนติเจนที่เคลือบอยู่บนปัดส์เป็นชุดแอนติเจนเอชแอลเอจากคนคนเดียวเท่านั้น สามารถระบุชนิดของแอนติบอดีได้ และผลจากการตรวจด้วยปัดส์นี้จะนำไปใช้คำนวณค่า PRA

#### 4.3.2.3 Single antigen beads (SABs) เป็นปัดส์ชนิดที่มีการเคลือบด้วย

แอนติเจนเอชแอลเอชนิดเดียวและโลคัสเดียวในแต่ละเม็ดปัดส์ ทำให้ผลการตรวจสามารถระบุชนิดของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอได้จำเพาะและแม่นยำ การทดสอบด้วยปัดส์ชนิดนี้จะมีความไวและความจำเพาะในการทดสอบสูงกว่าปัดส์ชนิดอื่น



<i>Application</i>	screening	specification	specification
<i>Relative antigen density</i>	low	intermediate	high
<i>Resolution</i>	–	★	★★★
<i>Antigen source</i>	Platelets, EBV-transformed cell line	EBV-transformed cell line	Recombinant cell line
<i>Antigen composition per bead</i>	Complete class I or II phenotype of 3–5 individuals	Complete class I or II phenotype of 1 individual	Single allelic antigen

ภาพที่ 9 เปรียบเทียบความแตกต่างของส่วนประกอบและความสามารถของปัดส์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ ด้วยเทคนิค Luminex® (28)

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอจะนำไปพิจารณาร่วมกับแอนติเจนเอชแอลเอของผู้ให้ หากผู้รับมีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอและมี DSA เป็นบวก จะทำให้โอกาสเกิดผลบวกเมื่อตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (Crossmatching) เพิ่มสูงขึ้น และเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดการปฏิเสธอวัยวะ เนื่องจากแอนติบอดีที่เป็น DSA ในผู้รับสามารถจับกับแอนติเจนเอชแอลเอบนผิวเซลล์ของเนื้อเยื่อ เกิดการทำลายเซลล์และสูญเสียอวัยวะไปในที่สุด (21, 28, 29)

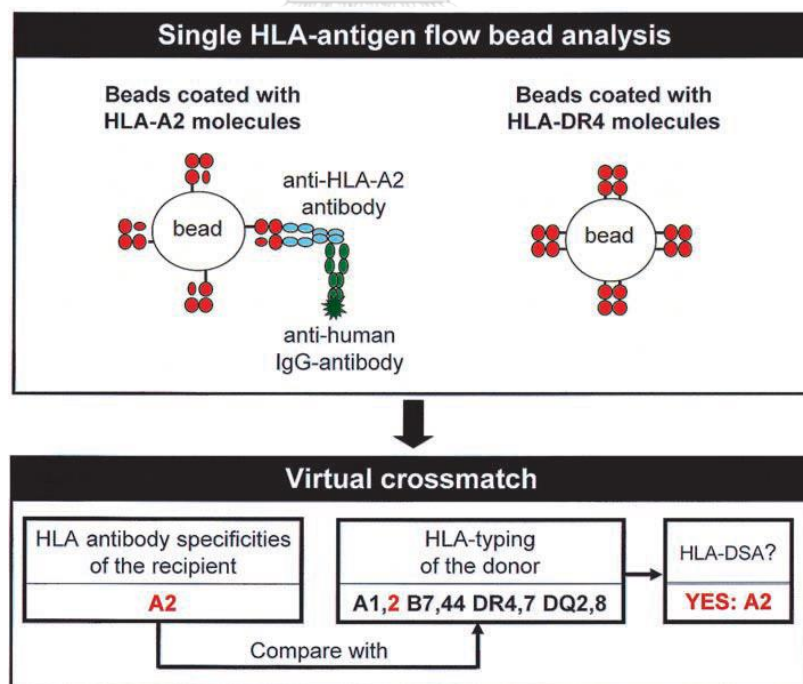
#### 4.4 การตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ (HLA Crossmatching)

เป็นการตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อระหว่างผู้ให้กับผู้รับ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาแอนติบอดีของผู้รับที่สามารถทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อหรือมีความจำเพาะต่อแอนติเจนของผู้ให้ และอาจก่อให้เกิดการปฏิเสธอวัยวะได้ จัดเป็นการทดสอบสำคัญที่มีผลต่อการพิจารณาปลูกถ่ายไตอย่างมาก (25, 30, 31) สามารถแบ่งชนิดจากการทำปฏิกิริยาได้ 2 กลุ่มคือการตรวจความเข้ากันได้แบบจำลอง (Virtual Crossmatch) และการตรวจความเข้ากันได้ของเซลล์ (cells-based Crossmatch)

**4.4.1 การตรวจความเข้ากันได้แบบจำลอง (Virtual Crossmatch, VXM** การตรวจความเข้ากันได้แบบจำลองคือการทดสอบความเข้ากันได้ที่อาศัยการเทียบผลการทดสอบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอของผู้รับกับผลการตรวจแอนติเจนเอชแอลเอของผู้ให้แล้วนำไปพยากรณ์ผลของการตรวจความเข้ากันได้ของเซลล์ (cells-based crossmatch) โดยไม่มีการทดสอบการทำปฏิกิริยาจริงระหว่างเซลล์ลิมโฟไซต์และน้ำเหลือง หลักการของ VXM คือการพิจารณาผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอจากเทคนิคที่มีความไวสูงและเป็นเทคนิคมาตรฐานในปัจจุบันคือเทคนิค Luminex® ด้วยเม็ดปดซ์ชนิด Single antigen beads (SABs) โดยแต่ละห้องปฏิบัติการจะมีการกำหนดค่า MFI ที่ยอมรับได้สำหรับการวิเคราะห์ผลของแต่ละห้องปฏิบัติการเอง จากนั้นใช้ผลแอนติบอดีที่ตรวจได้มาเทียบกับแอนติเจนของผู้ให้ เพื่อตรวจสอบหา DSA ถ้ามี จะนับว่า VXM เป็นบวก (ภาพที่ 10) ดังนั้นความไวและความจำเพาะของเทคนิคนี้จึงขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรวจแอนติเจนและแอนติบอดี รวมถึงการกำหนดค่า MFI ที่เหมาะสมสำหรับการระบุชนิดแอนติบอดี ด้วยจากการศึกษาของ A. Piazza และคณะ พบว่า VXM มีความไวถึง 100% เมื่อเทียบกับ CDC-XM และ FCXM โดยกำหนดค่า MFI ที่ยอมรับได้ของการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอน้อยกว่า 5000 หมายถึง แอนติบอดีต่อเอชแอลเอ ที่ตรวจพบแต่มีค่า MFI น้อยกว่า 5000 จะแปลผลเป็นผลลบ และไม่นำมาเทียบกับแอนติเจนเอชแอลเอของผู้ให้ แต่ยังคงข้อจำกัดในกลุ่มของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอไอส์สอื่นที่ไม่ได้ตรวจระบุชนิดของแอนติเจนเอชแอลเอไว้ แต่มีการพบผลบวกในการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ (cell-based crossmatch) (32)

การทำ VXM ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย และมีความพยายามจะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการพิจารณาความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายไตแทนการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ (Cell-based methods) แต่มีการพบข้อจำกัดและปัจจัยที่ส่งผลให้การทำ VXM มีข้อผิดพลาดได้หลายปัจจัย โดยเฉพาะในกลุ่มผู้รับที่มี การตรวจพบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอจำนวน

มาก ในปีค.ศ. 2017 มีการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดผลลบปลอมในผู้รับกลุ่มนี้โดย VivekJani และคณะ พบว่ามีปัจจัยหลักจำนวน 4 ข้อ ที่ทำให้ผล VXM มีความผิดพลาดเกิดขึ้น คือ 1. ผลลบปลอมจากเทคนิคการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอซึ่งการตรวจด้วยเทคนิค Luminex® เช่น จากกรณีที่แอนติเจนบนเม็ดบีดส์มีการเสียดสีสภาพ, มีการกำหนดค่า MFI ที่ยอมรับได้ไม่เหมาะสม 2. ชนิดของแอนติเจนบนบีดส์ที่ใช้ตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอไม่ครอบคลุมเอชแอลเอแอนติเจนทุกชนิด เช่น กลุ่มเอชแอลเอแอนติเจนที่พบน้อยในประชากร (Low frequency) ทำให้บีดส์ไม่สามารถตรวจจับแอนติบอดีในกลุ่มนี้ได้ รวมถึงกรณีที่การตรวจแอนติเจนเอชแอลเอของผู้ให้ไม่ครอบคลุมในบางโลคัสด้วย 3. กลุ่มผู้รับที่มีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำ (Low titer) หลายชนิด เมื่อทำ VXM จะให้ผลลบ แต่ในการทำปฏิกิริยาของเซลล์ อาจเกิดการเสริมแรง (Synergist) กันของแอนติบอดีได้ 4. กรณีที่ผู้รับมีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณสูง (High titer Antibody) อาจเกิดปรากฏการณ์โปรโซน (Prozone phenomenon) คือการมีแอนติบอดีจำนวนมากเกินไปในตัวอย่างไม่สมดุลกับอัตราส่วนของแอนติเจนในการทำปฏิกิริยาการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ ดังนั้นการทดสอบ CXM จึงยังเป็นการทดสอบที่จำเป็นจะต้องทำการปลูกถ่าย โดยอาจใช้ VXM เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดกรองผู้รับเบื้องต้นก่อนได้ (33, 34)



ภาพที่ 10 แสดงหลักการเทคนิค Virtual Crossmatch (VXM)

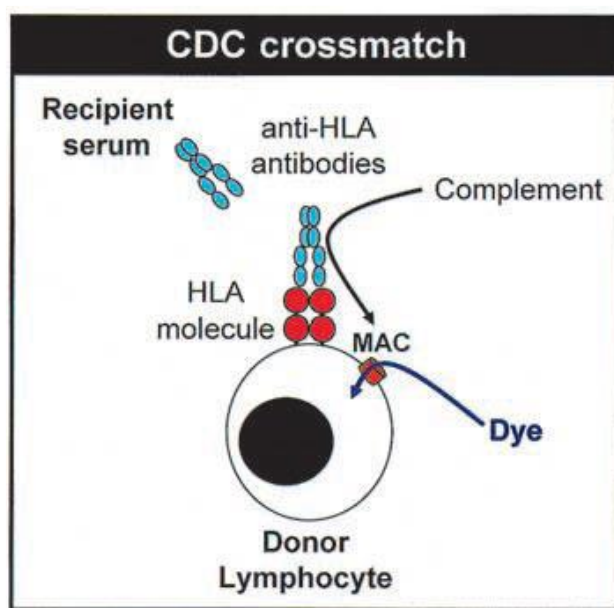
#### 4.4.2 การทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ (Cell-based Crossmatch, CXM)

การทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์เป็นการทดสอบดั้งเดิมตั้งแต่ยุคแรกของการทดสอบความเข้ากันได้ ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะเริ่มต้นเป็นที่สนใจตั้งแต่ปีค.ศ. 1964 ที่มีการศึกษาหาเทคนิคที่เหมาะสมในการทดสอบความเข้ากันได้โดย Terasaki P. และคณะ ทำการพัฒนาเทคนิคจาก Microdroplet Assay มาเป็นเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์มาทำการทดสอบ แยกการทดสอบเป็น 2 ชุดคือ T cell และ B cell เนื่องจากมีการแสดงออกของแอนติเจนเอชแอลบนผิวเซลล์ที่ต่างกัน อีกทั้งยังทำการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างแอนติบอดีต่อเอชแอลกับการปฏิเสธอวัยวะ พบว่าผู้ป่วยที่มีผลการทดสอบความเข้ากันได้เป็นบวกมีอัตราการปฏิเสธอวัยวะสูงกว่ากลุ่มที่มีผลเป็นลบ (7, 9) ต่อมาในปีค.ศ. 1966 ความสัมพันธ์ระหว่างการปฏิเสธอวัยวะและแอนติบอดีต่อเอชแอลที่ผู้รับสร้างไว้ก่อนการปลูกถ่ายได้รับการยืนยันอีกครั้ง เมื่อมีการศึกษาของ Kissmeyer-Neilson และคณะที่พบการปฏิเสธอวัยวะชนิด Hyper Acute Rejection ในผู้รับอวัยวะที่มี DSA ต่อผู้ให้ (8) ปัจจุบันการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์มีเทคนิคที่หลากหลายมากขึ้น คล้ายกับการตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธีที่นิยมใช้ได้แก่ เทคนิคในกลุ่ม Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) และ Flow cytometry crossmatching (FCXM)

##### 4.4.2.1 เทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM)

มีหลักการ คือ ลิมโฟไซต์ของผู้ให้ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองของผู้รับ โดยทำการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์สำหรับทดสอบเป็น T cell และ B cell ทำการทดสอบแยกเป็น 2 ชุดเนื่องจากมีเป้าหมายในการตรวจจับแอนติเจนเอชแอลที่แสดงออกแตกต่างกันบนผิวเซลล์ ถ้าผู้รับมีการสร้างแอนติบอดีมาก่อน และแอนติบอดีที่อยู่ในน้ำเหลืองนั้นสามารถจับจำเพาะกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ได้ จะเกิดการจับกันเป็น Antigen-Antibody complex และเมื่อเติมโปรตีนคอมพลีเมนต์ลงในปฏิกิริยา จะสามารถเกิดปฏิกิริยาจับคอมพลีเมนต์ มีการสร้าง Membrane Attack Complex (MAC) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุน สารน้ำจากภายนอกเซลล์จึงสามารถไหลเข้าภายในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด จากนั้นเติมสีอีออสิน (Eosin) เพื่อย้อมเซลล์ที่ตาย เนื่องจากสีจะสามารถไหลเข้าสู่ภายในเซลล์ และทำการย้อมพื้นหลังด้วยเพื่อให้การอ่านผลชัดเจนขึ้น หรือย้อมด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งองค์ประกอบภายในเซลล์และนอกเซลล์จะติดสีแตกต่างกัน จากนั้นจึงนำไปอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 11) เซลล์ที่ตายจะย้อมติดสีและนับว่าแสดงผลเป็นบวก แปลผลการทดสอบโดยการประเมินจำนวนเซลล์ที่ตายแล้วให้คะแนนตามเกณฑ์ในตารางที่ 3 กรณีที่มีการทดสอบ

กับน้ำเหลืองปกติ ร่วมกับน้ำเหลืองที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dithiothreitol (DTT) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสามารถในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโครงสร้างของแอนติบอดีชนิด IgM ดังนั้นจะทำให้สามารถแปลผลได้ว่าการทดสอบให้ผลบวกจากแอนติบอดีชนิดใด ให้ทำการแปลผลตามเกณฑ์ในตารางที่ 4 โดยผลบวกจากแอนติบอดีชนิด IgG จะเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไต เนื่องจากเป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดการปฏิเสธไตได้



ภาพที่ 11 แสดงหลักการเทคนิค Complement-dependent microcytotoxicity crossmatch (CDC-XM) (29)

ตารางที่ 3 แสดงเกณฑ์การให้คะแนนและการแปลผลทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM (11)

Score	% cell death	Result
0	Not readable	
1	0 -10	Negative
2	11-20	
4	21-50	Weak Positive
6	51-80	Positive
8	81-100	

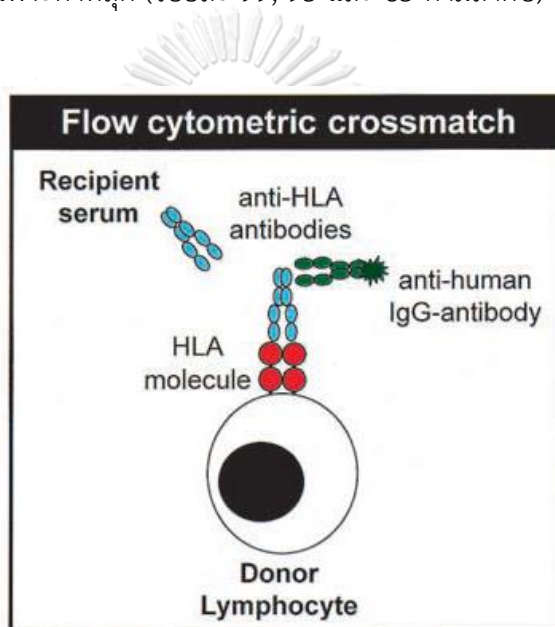
**ตารางที่ 4** แสดงเกณฑ์การแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM ในกรณีที่มีการทดสอบกับน้ำเหลืองที่ทำปฏิกิริยากับ DTT (14)

Serum	Result		
Patient's Serum (Untreat)	Negative	Positive	Positive
Patient's Serum+DTT (treat)	Negative	Negative	Positive
Summary	Negative	IgM	IgG

ถึงแม้ว่าเทคนิค CDC-XM จะมีความจำเพาะในการตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเออยู่ในระดับดีเพียงพอที่จะตรวจจับแอนติบอดีที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา Hyperacute rejection ได้แต่ยังมีข้อจำกัดในด้านความไวที่ไม่สามารถตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำ (Low titer) ที่อาจส่งผลต่อการปฏิเสธอวัยวะในรูปแบบอื่นในระยะยาว รวมถึงไม่สามารถตรวจจับแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนคอมพลีเมนต์ ดังนั้นจึงมีความพยายามพัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มความไวให้สูงขึ้น เช่น การเพิ่มขึ้นตอนการล้างแอนติบอดีส่วนเกินในปฏิกิริยา แล้วเติม Anti-Human Globulin (AHG) เพื่อทำหน้าที่เพิ่มความแรงของปฏิกิริยา (enhance reaction) เรียกเทคนิคนี้ว่าเทคนิค AHG-CDC (10) โดยใช้หลักการเดียวกันกับ CDC-XM แต่ขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้เกิดปฏิกิริยาในระบบคอมพลีเมนต์ได้ดีขึ้น

**4.4.2.2 Flow cytometry Crossmatching (FCXM)** เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาในเวลาต่อมา ในปี.ศ. 1983 Garovoy MR. และคณะ นำเสนอการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอที่เกิดขึ้นก่อนแล้วและมี DSA เป็นบวก ในผู้ป่วยที่เข้ารับการปลูกถ่ายไต โดยนำเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์มาประยุกต์ใช้ในการวัดผลปฏิกิริยา พัฒนาเป็นเทคนิคใหม่ที่มีหลักการคือเมื่อน้ำเหลืองมี DSA เป็นบวกจะมีปฏิกิริยาแอนติเจนแอนติบอดี (Antigen-Antibody complex) เกิดขึ้น จากนั้นทำการเติม Secondary Antibody ที่จำเพาะต่อ Human IgG และติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์เพื่อตรวจจับแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาและมีการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD marker บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เพื่อระบุชนิดของเซลล์ที่ทดสอบแทนการแยกเซลล์เป็น 2 กลุ่มในเทคนิค CDC โดยกลุ่มหลักของ CD marker ที่ใช้คือ CD3 เป็น marker สำหรับ T cell และ CD19 เป็น marker สำหรับ B cell แล้วจึงวัดผลจากสัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent intensity, FI) จากแอนติบอดีที่ติดฉลากไว้และทำปฏิกิริยาโดยใช้เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงสามารถวัดปฏิกิริยาจากเซลล์จำนวนมากได้ในการทดสอบครั้งเดียว

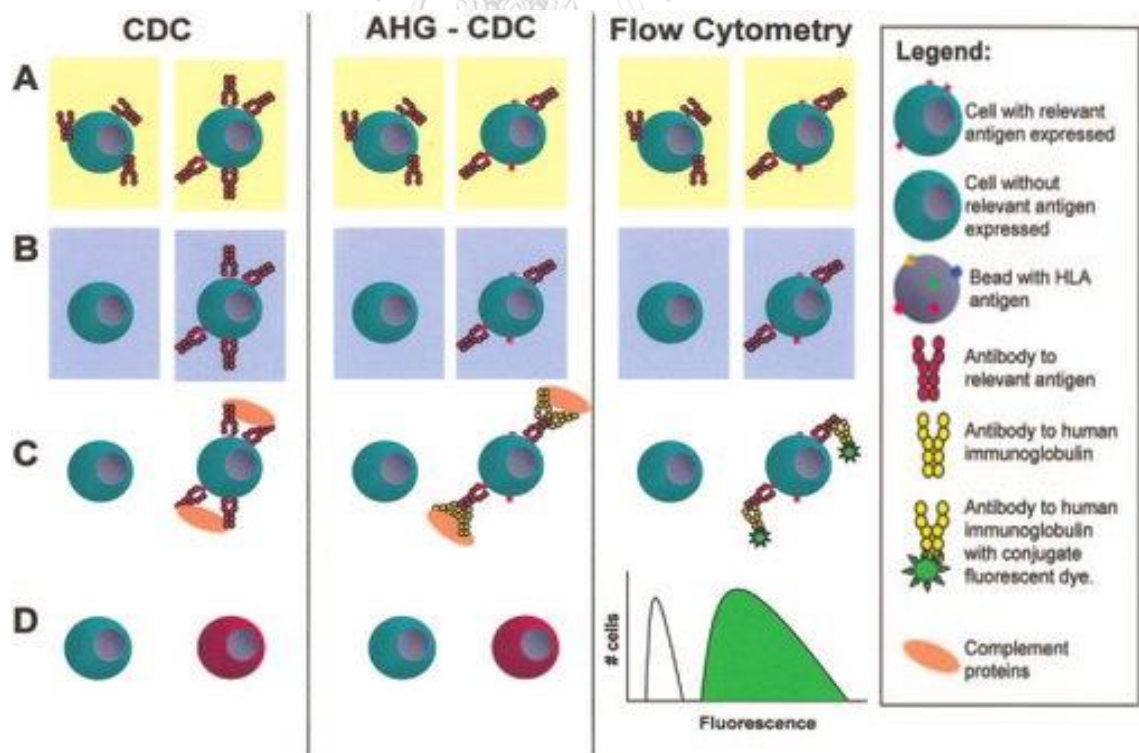
สามารถตรวจจับได้ทั้งแอนติบอดีที่ต้องใช้คอมพลีเมนต์ (fixing complement antibody) และแอนติบอดีที่ไม่ต้องใช้คอมพลีเมนต์ (non fixing complement antibody) จากการศึกษาพบว่าเทคนิค FCXM สามารถตรวจพบแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่เจือจาง สูงสุดคือ 1:1024 มีความไวมากกว่าเทคนิค CDC มาตรฐานและเทคนิค CDC ที่มีการประยุกต์อื่นๆ 30-250 เท่า (12) จากการศึกษาของ E.K. Ho และคณะในปีค.ศ. 2008 ทำการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของการทดสอบความเข้ากันได้ของเทคนิค CDC, Solid Phase Assays Virtual Crossmatching (SPA-VXM) และ FCXM กับการเกิดการสูญเสียอวัยวะพบว่าเทคนิค FCXM มีความไวสูงที่สุด (ร้อยละ 5, 15 และ 17 ตามลำดับ) แต่มีความจำเพาะต่ำที่สุด (ร้อยละ 99, 93 และ 85 ตามลำดับ) (35)



ภาพที่ 12 แสดงหลักการตรวจทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี (Flow Cyometry Crossmatching, FCXM) (29)

นอกจากความไวที่เพิ่มขึ้น FCXM ยังแสดงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบกับการพยากรณ์ผลการปลูกถ่ายไต และพบว่าผลการตรวจที่ให้ผลลบมีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของไตทั้งในระยะสั้นและระยะยาวที่ดีขึ้น โดยในปีค.ศ. 2000 O'Rourke RW และคณะได้นำเสนองานวิจัยเกี่ยวกับความสามารถในการพยากรณ์ผลอัตราการอยู่รอดของไตระยะยาว (long-term clinical outcome) ของการตรวจความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ในผู้ป่วยกลุ่มผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอหลายชนิด (highly sensitized) คือกลุ่มผู้ป่วยที่มีการตรวจพบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอจำนวนมาก การศึกษานี้กำหนดให้เป็นกลุ่มผู้รับที่มีผล Panel Reactive Antibody (PRA) มากกว่า 30% และได้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายระหว่างปีค.ศ. 1990 ถึง 1995 ณ

University of California ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 100 ราย พบว่าผู้ป่วยที่มีผล FCXM เป็นบวกมีอัตราการเกิด Acute rejection ภายใน 1 ปีหลังการปลูกถ่ายมากกว่ากลุ่มที่เป็นลบ ( ร้อยละ 69 ต่อ ร้อยละ 45) (36) ต่อมา R.J. Graff และคณะทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบจากเทคนิค CDC และ FCXM กับผล 1 ปีและ 5 ปี graft survival โดยศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตที่มีผลการทดสอบด้วย CDC เป็นลบ ตั้งแต่ปีค.ศ. 1995 ถึง 2009 จากผู้บริจาคไตสมองตาย (N= 7,493) และผู้บริจาคไตมีชีวิต (N=7,246) ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค FCXM ผู้ป่วยที่มีผล T cell FCXM เป็นบวกจากผู้บริจาคทั้ง 2 กลุ่มมีผล 5 ปี อัตราการอยู่รอดขอไตลดลงเป็นร้อยละ 11.5 และ 8.8 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ FCXM เป็นลบ ส่วนกลุ่มที่มี B cell FCXM เป็นบวกมีผล อัตราการอยู่รอดของไต 5 ปี ลดลงร้อยละ 9.6 และ 7.6 ตามลำดับ นอกจากนี้กลุ่มที่ T cell FCXM เป็นบวก ยังแสดงความสัมพันธ์กับการมีค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ (relative risk, RR) ของการสูญเสียกราฟท์ภายใน 1 ปีหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ สูงกว่ากลุ่มที่เป็นลบถึงร้อยละ 51 ส่วนกลุ่ม B cell FCXM เป็นบวกแสดงความสัมพันธ์กับความเสี่ยงสัมพัทธ์ในการสูญเสียกราฟท์ภายใน 1ปีและ 5 ปีสูงกว่ากลุ่มที่เป็นลบถึงร้อยละ 42 (37)



ภาพที่ 13 แสดงหลักการของเทคนิค CDC เทียบกับ AHG-CDC และ FCXM (38)



ถึงแม้ว่า FCXM จะเป็นวิธีที่มีความไวสูงและมีประโยชน์ในด้านการตรวจจับ แอนติบอดีอื่นนอกเหนือจากแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ (non-HLA antibodies) ที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา ปฏิเสธอวัยวะได้ แต่จากการศึกษายังพบว่ามีอัตราการเกิดผลบวกปลอมอยู่ สาเหตุหนึ่งของผลบวกปลอมที่เกิดขึ้นคือการมีแอนติบอดีอื่น ๆ ชนิด IgG ที่ไม่เกี่ยวข้อง (irrelevant IgG) เข้าจับกับส่วน Fc receptor (FcR) จัดเป็นการจับกันแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific binding) บนผิวลิมโฟไซต์ชนิด B cells ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ FI อย่างผิดปกติ เพื่อแก้ไขปัญหานี้ในปีค.ศ. 1995 Peter I. Lobo และคณะ จึงใช้ Pronase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยส่วน FcR บนผิวเซลล์ได้ มาทดสอบกับ เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคปกติจำนวน 6 ราย เปรียบเทียบผลระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่ทำ ปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว ทดสอบกับน้ำเหลืองของผู้ป่วยเอง (Autologous serum), ตัวอย่างที่ให้ผล ลบ (Negative control, NC) และน้ำเหลืองที่มีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC-XM และ FCXM พบว่าเซลล์ปกติที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์บางรายแสดงค่า FI สูงกว่าเซลล์ที่ผ่านการทำ ปฏิกิริยากับเอนไซม์ Pronase แล้วในการทดสอบกับตัวอย่างน้ำเหลืองที่มี DSA เป็นลบ โดยเมื่อ FcR บนผิวเซลล์โดนทำลาย การจับกันแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific binding antibody) บน B cells ไม่ สามารถเกิดขึ้นได้ ทำให้ค่า Background FI ลดลงและไม่เกิดผลบวกปลอมในการแปลผล (39) ต่อมา ในปีค.ศ. 2010 Sarah J. และคณะ ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Pronase กับการทดสอบ FCXM โดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบ FCXM กับน้ำเหลืองที่ทราบชนิดของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ แล้วประเมินการ ทำงานของเอนไซม์ Pronase ด้วย CD20 ซึ่งเป็น CD marker ตัวหนึ่งของ B cell โดยการย่อยส่วน FcR ของเอนไซม์ Pronase จะทำให้ CD20 บนผิวเซลล์ลดจำนวนลง ผลการทดสอบพบว่ากลุ่มที่ใช้ เอนไซม์ความเข้มข้นสูง ไม่พบ CD20 บนผิว B cell และมีการแสดงออกของแอนติเจนเอชแอลเอลดลง จำนวน 28 จาก 30 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มความเข้มข้นเอนไซม์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการ แสดงออกของ CD20 ลดลงร้อยละ 15 แต่ผลการแสดงออกของแอนติเจนเอชแอลเอมีความแตกต่าง กันในแต่ละเซลล์ เมื่อพิจารณาผล FCXM พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า FI ลดลง 5 จาก 16 ตัวอย่าง (31%) ใน T cells และ 15 จาก 16 ตัวอย่าง (94%) ใน B cells. ในขณะที่มี T cell จำนวน 5 ตัวอย่างที่ผลไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนอีก 6 ตัวอย่างมีค่า FI เพิ่มขึ้นร้อยละ 18-73 การ ทดสอบกับเอนไซม์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของค่า FI ในปฏิกิริยา 20 จาก 23 ตัวอย่างสำหรับ T cells (87%) แต่ใน B cells แสดงค่า FI ที่ลดลงจำนวน 18 ตัวอย่าง เพิ่มขึ้น 2 ตัวอย่าง และไม่พบการเปลี่ยนแปลง 3 ตัวอย่าง (40) ซึ่งในปีต่อมา Park H. และคณะได้นำเสนอ

การศึกษาการเกิดผลบวกปลอมใน T cells ที่ทำการทดสอบ FCXM โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 2 mg/ml พบว่ากลุ่มตัวอย่างทดสอบที่ใช้เอนไซม์ Pronase (Pronase treated cell, PT) มีอัตราการเกิดผลบวกสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างทดสอบที่ไม่ใช้เอนไซม์ Pronase (Pronase-nontreated cell, PN) อย่างมีนัยยะสำคัญ โดยเมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม PT+/PN- จำนวน 16 ตัวอย่างพบว่าตัวอย่างมีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ Class I และมี DSA เป็นบวก จำนวน 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 6.3 ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม PT- /PN- จำนวน 46 ตัวอย่างที่พบว่ามีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ Class I และมี DSA เป็นบวก จำนวน 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 2.2 และอัตราการเกิดการปฏิเสธอวัยวะที่มีสาเหตุจากแอนติบอดี (AMR) ไม่แตกต่างกัน (41) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อการแสดงออกของ Antigen บนผิวเซลล์ การเกิดปฏิกิริยาในการทดสอบ FCXM และการใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้เกิดผลบวกปลอมได้

นอกจากการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (Non-specific antibody) แล้วปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ส่งผลต่อความถูกต้องของผลทดสอบ FCXM คือการกำหนดค่า Negative-Positive cutoff ในการแปลผล เนื่องจากเทคนิค FCXM มีความสามารถในการตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำ (Low titer) ได้ดี ดังนั้นค่าที่ใช้ในการแปลผลจึงต้องให้ผลที่สอดคล้องกับผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอและผลทางคลินิก (clinical outcome) ด้วย ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Luminex® จะแสดงค่าสัญญาณ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของแอนติบอดีแต่ละตัวที่ตรวจพบ ซึ่ง Toshihito H. และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำและมี DSA เป็นบวก ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด AMR และ Chronic rejection โดยนำตัวอย่างก่อนทำการปลูกถ่ายไตของผู้ป่วยมาทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM และ FCXM กลุ่มที่ให้ผล CDC-XM เป็นบวก หรือ T-cell FCXM เป็นบวกจะถูกแยกออกจากกลุ่มตัวอย่าง แล้วทดสอบหาแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยบีดส์ชนิด SABs เมื่อพิจารณาผลทางคลินิกหลังการปลูกถ่ายพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่มี DSA เป็นบวก จำนวน 24 รายมีค่าครีเอตินิน (Creatinine) และค่าโปรตีนในปัสสาวะสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญภายใน 4 ปีหลังทำการปลูกถ่าย พบอัตราการรอดของอวัยวะ (Graft survival rate) 5 ปีหลังการปลูกถ่ายไตของกลุ่มที่มี DSA เป็นบวกร้อยละ 83.3 ในขณะที่กลุ่มที่มี DSA เป็นลบร้อยละ 93.0 (39, 42, 43) แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำและมี DSA เป็นบวกส่งผลต่ออัตราการรอดของอวัยวะที่ทำการปลูกถ่าย ดังนั้นเทคนิคการตรวจความเข้ากันได้ที่ดีจึงควรมีความจำเพาะและความไวต่อแอนติบอดีที่เหมาะสม

ในปีค.ศ. 2018 มีการวิจัยและพัฒนาเทคนิค FCXM โดยการศึกษาของ Robert S. Liwski และคณะ ทำการปรับปรุงวิธีการทำ FCXM ใหม่ที่ใช้ระยะเวลาในการทดสอบลดลงได้ถึงร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับ FCXM วิธีมาตรฐาน โดยลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และน้ำเหลืองลง รวมถึงระยะเวลาในการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ แต่ยังคงมีความจำเพาะร้อยละ 95.7 และความไวร้อยละ 96.8 นอกจากนี้ยังใช้ปริมาณเซลล์ลิมโฟซัยต์ในการทดสอบต่อครั้งลดลง คือ  $1.5-2.5 \times 10^5$  เซลล์เท่านั้น เนื่องจากเปลี่ยนการทำปฏิกิริยาจากในหลอดทดลองเป็นการใช้เพลท 96 หลุม แทน (43) ภายหลัง R.A. Al Attas ได้ทำการประเมินเทคนิค FCXM ที่ทดสอบด้วยเพลท 96 หลุม เช่นกันพบว่าได้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกับการใช้หลอดทดลองปกติ และสามารถลดต้นทุนในการทดสอบรวมถึงระยะเวลาการทดสอบได้ (44)

#### 4.5 การแปลผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (Crossmatch) เป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการที่สำคัญในการลดอัตราการปฏิเสธอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปฏิเสธอวัยวะในกลุ่ม Hyperacute rejection เมื่อเทคนิคการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้รับการพัฒนาให้ดีขึ้น ส่งผลให้ผลการทดสอบสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น เช่น สามารถขยายเป้าหมายในการป้องกันการปฏิเสธอวัยวะไปสู่กลุ่มอื่นที่อาจจะใช้ระยะเวลานานกว่า รวมถึงใช้เป็นข้อมูลสำหรับการใช้ยากดภูมิในผู้รับเพื่อรักษากราฟท์หรืออวัยวะให้ยังคงทำงานได้ให้ยาวนานที่สุดด้วย (11, 31, 45)

เทคนิคที่ใช้ทดสอบความเข้ากันได้ทุกเทคนิคมีวัตถุประสงค์หลักเดียวกันคือการตรวจหา DSA ของผู้รับที่สามารถทำลายกราฟท์ที่ปลูกถ่ายไปได้ โดยวัดผลจากการเกิดปฏิกิริยา เช่น เซลล์ตาย หรือการวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในเทคนิค FCXM ซึ่งถูกคาดหวังให้มีความไวและความจำเพาะสูงเพื่อความถูกต้องแม่นยำของผลการตรวจวิเคราะห์ แต่ในความเป็นจริง ไม่มีเทคนิคใดสมบูรณ์แบบ ทุกเทคนิคต่างก็มีข้อจำกัด รวมถึงการวิเคราะห์ผลเพื่อตัดสินว่าควรปลูกถ่ายอวัยวะหรือไม่ จำเป็นต้องใช้ผลจากหลายส่วนประกอบกัน ดังนั้นเพื่อให้การแปลผลมีความถูกต้องจึงมีข้อแนะนำที่ควรคำนึงถึงก่อนทำการแปลผลการทดสอบดังนี้ (11)

1. มีการตรวจพบแอนติบอดีในผู้รับหรือไม่ (ถ้ามี) เป็นชนิดใด, มีความเกี่ยวข้องกับ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อกราฟท์หรืออวัยวะหรือไม่ ไม่เฉพาะ HLA แอนติบอดีเท่านั้น แต่รวมถึงแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระบบหมู่เลือดเอบีโอ กลุ่มแอนติบอดีต่อเอชแเอเอในปริมาณต่ำ และกลุ่มแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ไม่ใช่เอชแอลเอด้วย เนื่องจากการตรวจพบแอนติบอดีเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการปลูกถ่ายให้มากขึ้น

2. ผู้รับมีประวัติการสัมผัสแอนติเจนที่จะก่อให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (Pre-existing antibodies) ที่เกี่ยวข้องหรือไม่ เช่น ประวัติการตั้งครรภ์ การรับเลือด ผลการปลูกถ่ายอวัยวะครั้งก่อน เพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการสร้างแอนติบอดีของผู้รับ

3. ผู้รับเคยมีผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอหรือไม่ (ถ้ามี) ทดสอบเมื่อไหร่ ด้วยเทคนิคใด และมีการระบุชนิดของแอนติบอดีที่เคยตรวจพบหรือไม่ ในหลายห้องปฏิบัติการมีการนำน้ำเหลืองตัวอย่างที่เคยตรวจพบแอนติบอดีมาทดสอบความเข้ากันได้ (Crossmatching) คู่ไปกับน้ำเหลืองที่ทำการเจาะเก็บมาเป็นปัจจุบันด้วย เนื่องจากแอนติบอดีที่เคยตรวจพบถึงแม้ในร่างกายผู้รับ แอนติบอดีจะมีการลดระดับลงจนกระทั่งตรวจไม่พบในน้ำเหลืองปัจจุบัน แต่เมื่อผู้รับได้รับการกระตุ้นซ้ำจากแอนติเจนที่รับเข้าไปใหม่ก็อาจก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างรุนแรงได้

4. ที่มาของเซลล์ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เนื่องจากบนผิวเซลล์แต่ละชนิดก็มีการแสดงออกของแอนติเจนที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ เช่น ลิมโฟไซต์ชนิด T cell ที่มีการแสดงออกของแอนติเจนเอชแอลเอ class I ส่วนลิมโฟไซต์ชนิด B cells มีการแสดงออกของแอนติเจนเอชแอลเอทั้ง Class I และ II

5. แอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้รับเป็นชนิด IgM หรือ IgG และผู้รับมีการตรวจพบแอนติบอดีต่อตนเอง (Autoantibody) ด้วยหรือไม่ โดยส่วนมาก IgM จะไม่ก่อให้เกิดการปฏิเสธอวัยวะ

6. การปลูกถ่ายอวัยวะในครั้งนี้เป็น การปลูกถ่ายอวัยวะใด เนื่องจากแต่ละอวัยวะมีโอกาสเกิดการปฏิเสธในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยมีระบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกันออกไปด้วย หรือถ้าเป็นการปลูกถ่ายอวัยวะหลายชนิดในครั้งเดียว (multiple organ transplantation) จะให้ความสำคัญในการพิจารณาผลของอวัยวะที่นำเข้าไปปลูกถ่ายก่อน

7. การทดสอบความเข้ากันได้ (Crossmatching) ด้วยเทคนิคใด ในการทดสอบแบบ CXM มีเทคนิคหลักที่นิยมใช้อยู่ 2 เทคนิคคือ CDC-XM และ FCXM ที่มีประโยชน์และข้อจำกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมาแปลผลร่วมกันจึงทำให้มีโอกาสที่จะใช้ข้อดีของแต่ละวิธีมาทำการพิจารณาผลได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น มีการศึกษาพบว่าร้อยละ 80 ของผู้รับที่ให้ผล CDC-XM เป็นบวก เมื่อได้รับการปลูกถ่ายไตมีการปฏิเสธอวัยวะแบบ Hyperacute rejection เกิดขึ้น แต่ในทางกลับกันผู้รับอีกร้อยละ 20 ที่ให้ผลบวกเช่นกันกลับไม่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นผลจากข้อจำกัดของเทคนิคที่มีความไวและ

ความจำเพาะไม่เพียงพอจะตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำ (low titer) หรือแอนติบอดีชนิดอื่นที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเป็นเทคนิค AHG-CDC เพื่อให้มีความไวและจำเพาะสูงขึ้น แต่ก็ยังคงพบข้อจำกัดสำคัญเหมือนกับ CDC-XM คือต้องการเซลล์ที่มีชีวิต และความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง ทั้งยังต้องแยกเซลล์ออกเป็นชนิด T และ B cells ด้วย ส่วนการทดสอบด้วยเทคนิค FCXM ที่ได้รับการพัฒนาต่อมานับว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงที่สุด สามารถตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเอในปริมาณต่ำได้ และยังสามารถตรวจจับแอนติบอดีที่ไม่กระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ สามารถเลือกตรวจจับแอนติบอดีตามชนิด IgG หรือ IgM ได้ตามชนิดของ secondary antibody ที่เลือกใช้ สามารถลดเวลาในการแยกเซลล์ได้เนื่องจาก FCXM สามารถทดสอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยไม่จำเป็นต้องแยกชนิดของเซลล์ก่อนทดสอบ นอกจากนั้นผลการทดสอบจากเทคนิค FCXM ยังสามารถใช้วิเคราะห์ปฏิกิริยาในเชิงปริมาณได้จากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ คือสัญญาณ FI จะแปรผันไปตามปริมาณแอนติบอดีที่จับกับเซลล์ที่ทดสอบ

เนื่องจากแต่ละเทคนิคมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ดังนั้นการแปลผล สรุปผล ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะควรทำความเข้าใจเทคนิคการตรวจ และผลการทดสอบทั้งหมดก่อน รวมถึงทำการพิจารณาข้อมูลองค์ประกอบจากประวัติเดิมของผู้รับด้วย จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อแปลผลเพื่อประเมินว่าสามารถทำการปลูกถ่ายได้หรือไม่ ดังแสดงในตารางที่ 5 (11)

ตารางที่ 5 แสดงแนวทางการแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ (Crossmatching) และการประเมินความเสี่ยงในการปลูกถ่ายไตระหว่างผลการทดสอบจากเทคนิค CDC ร่วมกับ FCXM (11)

RISK <sup>a</sup>	Cytotoxicity		Flow		Interpretation
	T CELL	B CELL	T CELL	B CELL	
++++	Positive	Positive	Positive	Positive	Anti class I IgG may also contain anti class II IgG. High risk of hyperacute rejection. <b>“Do not transplant.”</b>
?	Positive	Negative	Positive	Negative	Probably not Anti class I because B cells should also be positive. Possible T cell specific antigen? Further characterization needed. ELISA or flow screens can be helpful.
++ to +++	Negative	Positive	Positive	Positive	Low titer anti class I, but can have anti class II also. Can cause hyperacute rejection if anti class II antibody is present in high titers, increased risk of accelerated acute and acute rejection, particularly in retransplant or sensitized candidates.
+ to ++	Negative	Negative	Positive	Positive	Low titer anti class I see above.
0 to +	Negative	Positive	Negative	Positive	Anti class II antibody, and/or very low titer anti class I, and/or IgG autoantibody. High titer anti class II may cause hyperacute rejection. May indicate increased risk of acute rejection in retransplant candidates and sensitized patients. Auto antibody low risk, may even be protective.

RISK <sup>a</sup>	Cytotoxicity		Flow		Interpretation
	T CELL	B CELL	T CELL	B CELL	
0 to +	Negative or Positive	Positive	Negative	Negative	IgM antibody, likely to be an auto antibody which is low risk. Possible low titer IgM anti class I detected early following a sensitizing event and prior to class switch to IgG. Autoabsorb to prove autoantibody and to rule out anti MHC IgM antibody.
0	Negative	Negative	Negative	Negative	No detectable anti MHC antibodies. Low risk transplant.

a. 0=very low risk

+ =slight risk, possible increased incidence of acute rejection episodes

++ =some risk of accelerated acute rejection, increased risk of acute rejection episodes

+++ =moderate risk, possible hyperacute rejection, risk of accelerated acute rejection and acute rejection

++++ = high risk, probable hyperacute rejection

## 5. การคัดเลือกผู้ป่วยและการทดสอบความเข้ากันได้ในกรณีผู้บริจาคไตสมองตาย

สำหรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตาย ซึ่งระยะเวลาและทรัพยากรในการทำทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์มีจำกัดจึงต้องมีการคัดเลือกผู้รับไตที่มีความพร้อมและเหมาะสมมาทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์ โดยเลือกจากรายชื่อผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตที่มีสถานะพร้อม (Active) ในฐานข้อมูลของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย และมีตัวอย่างน้ำเหลืองที่เจาะเก็บไม่เกิน 30 วัน (นับถึงวันที่ทำการทดสอบ) จัดเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตขาวและเกล็ดโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย คัดเลือกผู้ป่วยที่เหมาะสมโดยพิจารณาประวัติผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอของผู้ป่วยที่ไม่ตรงกับแอนติเจนเอชแอลเอของผู้บริจาค ร่วมกับการพิจารณาความเข้ากันได้ของหมู่เลือดในระบบเอบีโอ ผลความแตกต่างระหว่าง แอนติเจน

เอชแอลเอของผู้ให้และผู้รับ รวมถึงคุณสมบัติอื่นตามประกาศศูนย์รับบริจาคอวัยวะ แล้วจัดลำดับของ ผู้ป่วยตามคะแนนรวมจากเกณฑ์การจัดสรรไต ดังนี้

**5.1 หมู่เลือดในระบบเอบีโอ** ผู้ป่วยต้องมีหมู่เลือดเอบีโอตรงกันกับผู้บริจาคเท่านั้น ยกเว้นกรณีที่มีเอชแอลเอ (HLA-A, -B, -DR) ตรงกับผู้บริจาคทุกตัว หรือเป็น 0 Mismatch (Zero mismatch, 0 MM) ให้เรียงลำดับผู้ป่วยจากหมู่เลือดเดียวกันกับผู้บริจาคแล้วจึงตามด้วยผู้ป่วยที่มีหมู่ เลือดเอบีโอในกลุ่มที่เข้ากันได้

**5.2 แอนติเจนเอชแอลเอ** ผู้ป่วยจะได้รับคะแนนการเปรียบเทียบเอชแอลเอ แอนติเจนระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาค (HLA Antigen Mismatch, MM) โดยผู้ป่วยที่มีจำนวน แอนติเจนเอชแอลเอต่างกับผู้บริจาค (MM) น้อยกว่าได้คะแนนมากกว่า ดังนี้

- MM ของ HLA- B และ DR = 0 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 9 คะแนน
- MM ของ HLA- B และ DR = 1 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 7 คะแนน
- MM ของ HLA- B และ DR = 2 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 5 คะแนน
- MM ของ HLA- B และ DR = 3 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 3 คะแนน
- MM ของ HLA- B และ DR = 4 ตำแหน่ง
  - MM ของ HLA-A = 0 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 2 คะแนน
  - MM ของ HLA-A = 1 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 1 คะแนน
  - MM ของ HLA-A = 2 ตำแหน่ง ได้รับคะแนน 0 คะแนน

**5.3 ผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ (PRA)** โดยผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ PRA ต่างกันจะได้รับคะแนน ดังนี้

- ผู้ป่วยที่มีค่า PRA มากกว่า 80% ได้รับคะแนน 4 คะแนน
- ผู้ป่วยที่มีค่า PRA 50-80 % ได้รับคะแนน 2 คะแนน
- ผู้ป่วยที่มีค่า PRA น้อยกว่า 50% ได้รับคะแนน 0 คะแนน

**5.4 ผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอตรงกับเอชแอลเอของผู้บริจาค** จะไม่ได้รับ เลือกลงรับการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์กับผู้ให้รายนั้น

**5.5 ระยะเวลาที่ผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอรับไต (Waiting time)** ผู้ป่วยที่มีระยะเวลาการ รอรับไตมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยหมู่เลือดเดียวกันจะได้รับคะแนนจำนวน 5 คะแนน และผู้ป่วยที่เหลือ จะได้รับการคำนวณคะแนนโดยใช้วิธีบัญญัติไตรยางค์เทียบจำนวนวันที่รอรับไตนับจากวันแรกที่เข้า รับการฟอกไตจนถึงวันที่คำนวณคะแนน



## 5.6 อายุของผู้ป่วย

ผู้ป่วยเด็ก จะได้รับคะแนนมากกว่า โดยใช้เกณฑ์ช่วงอายุดังนี้

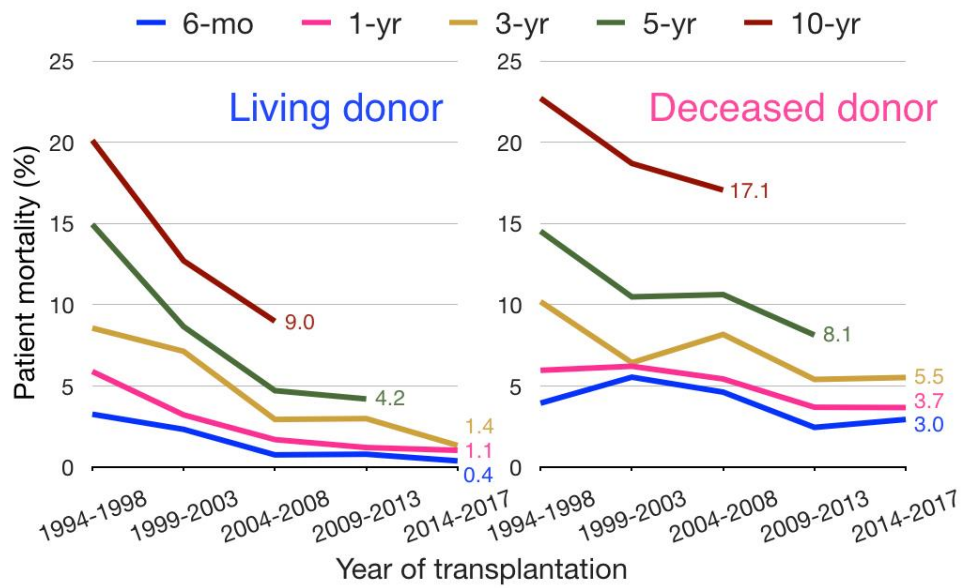
- ผู้ป่วยที่มีอายุ น้อยกว่า 11 ปี ได้รับคะแนน 7 คะแนน
- ผู้ป่วยที่มีอายุ 11- 18 ปี ได้รับคะแนน 4 คะแนน
- ผู้ป่วยที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป ได้รับคะแนน 0 คะแนน

## 5.7 ผู้ป่วยที่ได้รับคะแนนรวมสูงสุด ไม่พบประวัติผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอล

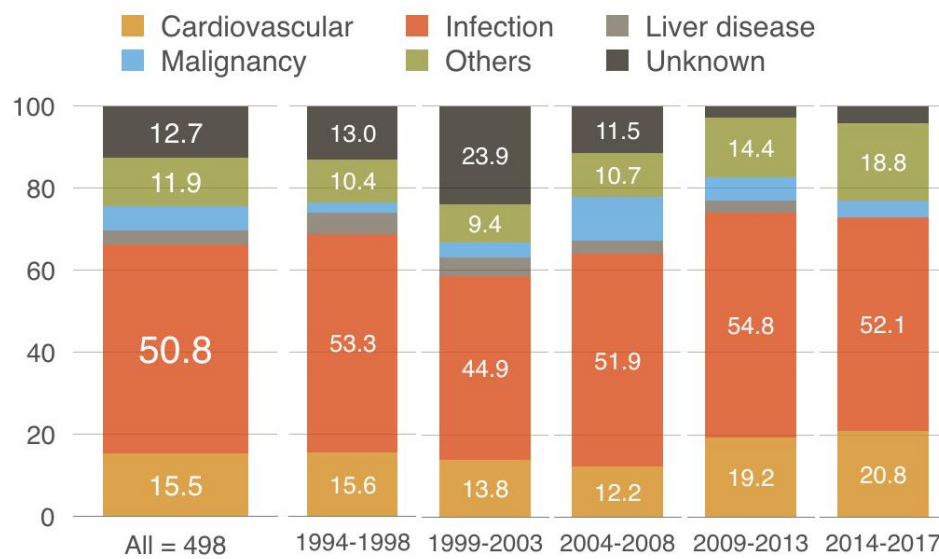
เอชแอลของผู้ป่วยตรงกับแอนติเจนเอชแอลเอของผู้บริจาค และผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อเป็นลบ หรือผลการทดสอบเป็นบวกที่พบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอชนิด IgM เท่านั้นจะได้รับการคัดเลือกกว่าเป็นผู้ป่วยที่เหมาะสมในการได้รับการจัดสรรไต(46)

## 6. การตรวจทางห้องปฏิบัติการในกรณีผู้บริจาคไตสมองตาย

ในกระบวนการคัดเลือกผู้ป่วยที่เหมาะสมรับบริจาคไตจากผู้บริจาคสมองตายในประเทศไทยนั้น พิจารณาประวัติผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอของผู้ป่วยเพื่อตรวจสอบ DSA ร่วมด้วยกับผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ (Crossmatch) โดยทดสอบแอนติบอดีต่อเอชแอลเอใช้เทคนิค Solid phase immunoassays โดยใช้ Luminex® ด้วยเม็ดบีดส์ชนิด Phenotype Panel system และทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC จากข้อกำหนดการทดสอบดังกล่าวส่งผลให้อัตราการพบผู้ป่วยเสียชีวิตภายหลังการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย ค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 14) และมีผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่พบการสูญเสียการทำงานของกราฟท์จากสาเหตุอื่นนอกจาก AMR เช่น การติดเชื้อ โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือระยะเวลาการจัดเก็บรักษาไตที่อุณหภูมิต่ำ (Cold Ischemic Time) เป็นต้น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 แสดงอัตราการตายของผู้ป่วย (Patient mortality) ที่เวลาต่างๆ แยกตามประเภทของการปลูกถ่ายไต (3)



ภาพที่ 15 สาเหตุของการเสียชีวิตของผู้รับไต แยกตามช่วงปีที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (3)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการในกรณีผู้บริจาคไตสมองตายด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC เป็นวิธีการตรวจตามมาตรฐานเช่นเดียวกันกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการกรณีผู้บริจาคไตที่มีชีวิต แตกต่างเพียงทำการทดสอบกับผู้ป่วยที่คัดเลือกมาอย่างน้อย 8 รายต่อผู้บริจาคไต 1 ราย ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบ 6-8 ชั่วโมง ระยะเวลาในการทดสอบมีความสำคัญในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

สำหรับผู้บริจาคไตสมองตาย เนื่องจากผู้บริจาคอยู่ในภาวะที่สามารถหยุดหายใจได้ตลอดเวลา หากผู้บริจาคหยุดหายใจจะส่งผลกระทบต่อหัวใจวายที่บริจาคไม่สามารถใช้งานได้ นอกจากนั้นเมื่อผ่าตัดนำไตออกจากร่างกายผู้บริจาคแล้วจะต้องนำไตนั้นไปปลูกถ่ายให้กับผู้ป่วยภายใน 24 ชั่วโมงเพื่อลดอัตราการสูญเสียการทำงานของกราฟท์ การบริหารจัดการผ่าตัดนำไตออกจากร่างกายผู้บริจาค นั้น บางครั้งอาจจำเป็นต้องนำไตออกมาเก็บรักษาไว้ในน้ำยารักษาสภาพไตและจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศา ระหว่างรอผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเนื่องจากผู้บริจาคอยู่ในสภาวะความดันตกและไม่สามารถควบคุมให้หัวใจทำงานได้ปกติ มีผู้ศึกษาพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาไตที่อุณหภูมิต่ำ (Cold Ischemic Time, CIT) มีผลต่อการทำงานของกราฟท์ โดยพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาไตสั้นทำให้อัตราการพบการทำงานของกราฟท์ช้า (Delay graft function) ลดลง และมีความสัมพันธ์กับอัตราการสูญเสียการทำงานของกราฟท์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาผลของ CIT ที่มีต่ออัตราการอยู่รอดของไตหลังการปลูกถ่ายโดย Claudio E.P. ในปีค.ศ. 2015 พบว่าการเก็บรักษาไตที่อุณหภูมิต่ำเป็นกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate: ATP) ซึ่งเป็นสารให้พลังงานสูงแก่เซลล์ โดยสร้างภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic) ทำให้ภายในเซลล์มีสภาวะเป็นกรด (Intracellular acidosis) และมีผลต่อการกระตุ้นสารก่อการอักเสบอื่นๆ เป็นผลให้ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นของ CIT จะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการสูญเสียไตได้ (47) และจากการศึกษาในปีค.ศ. 2017 โดย Abdulla K.S. และคณะ ทำการเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของไตที่ระยะ 6 ปีหลังการปลูกถ่ายไตในกลุ่มผู้รับไตจากผู้บริจาคไตสมองตายที่มี CIT ต่างกัน พบว่ากลุ่มที่มี CIT มากกว่า 30 ชั่วโมงส่งผลให้ค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ (RR) ของการสูญเสียกราฟท์เพิ่มขึ้นเป็น 1.32 สูงกว่ากลุ่มที่มี CIT น้อยกว่า 20 ชั่วโมงที่มี RR = 1.03 และกลุ่มที่มีค่า CIT ระหว่าง 21-30 ชั่วโมงที่มี RR = 1.12 (48)

ปัจจุบันการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อในผู้บริจาคไตสมองตายจำเป็นต้องใช้เซลล์ลิมโฟไซต์จากต่อมน้ำเหลืองหรือม้าม เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เพียงพอต่อการทดสอบผู้ป่วยอย่างน้อย 8 ราย เป็นอีกข้อจำกัดในการบริหารจัดการเนื่องจากต้องรอต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามที่ได้มาภายหลังจากการผ่าตัดนำไตออกจากผู้บริจาค ซึ่งหากสามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจ FCXM โดยการใช้เพลท 96 หลุมทดแทนเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ให้ลดเวลาการทดสอบ ลดปริมาณเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ใช้ทดสอบ หรือสามารถใช้เซลล์ลิมโฟไซต์จากเลือดผู้บริจาคทดแทนได้ โดยไม่เพิ่มต้นทุนค่าใช้จ่ายในการทดสอบ และสามารถนำมาใช้ในงานประจำได้จริง จะส่งผลให้เพิ่มอัตราการอยู่รอดของไตของผู้ป่วยคนไทยให้สูงขึ้นได้

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

##### 1. สารเคมีและวัสดุทางวิทยาศาสตร์

###### อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

- |  |   |
|--|---|
| 1. หลอดพลาสติกกันแหลม<br>ขนาด 15 มิลลิเมตร                   | บริษัท Corning จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 2. หลอดทดลองพลาสติก<br>ขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร                | บริษัท ThermoScientific จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |
| 3. Glass pasture pipettes<br>ความยาว 5 และ 9 นิ้ว            | บริษัท ThermoScientific จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |
| 4. Autopipette<br>(ขนาด 0.1-2, 2-10, 20-100, 1000 ไมโครลิตร) | บริษัท Gilson จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)           |
| 5. Multichannel Pipette<br>(ขนาด 5 - 300 ไมโครลิตร)          | บริษัท ThermoScientific จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |
| 6. Pipette tip<br>(ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร)          | บริษัท HYCON จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)            |
| 7. U bottoms 96 wells plate                                  | บริษัท Corning จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |

###### สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

- |  |   |
|--|---|
| 1. 1X Phosphate Buffer Saline (1XPBS)  | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 2. Deoxyribonuclease from bovine pancreas (DNase)  | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 3. Pronase E<br>(Protease from <i>Streptomyces griseus</i> )                                 | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 4. 1% Paraformaldehyde (PFA)   | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 5. Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG | บริษัท Jackson ImmunoResearch จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |

- |  |  |
|--|--|
| 6. Anti-human CD19 antibody<br>PE label to detect B cell | บริษัท Biolegend จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)       |
| 7. Anti-human CD3 antibody<br>PC5 label to detect T cell | บริษัท Biolegend จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)       |
| 8. Tryphan-blue  | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)   |
| 8. Lymphoprep (Ficoll-hypaque; FH)                       | บริษัท Corning จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)         |
| 9. Sucrose   | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)   |
| 10. Dithiothreitol (DTT)                                 | บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)   |
| 11. Heat Inactivate Fetal Craft Serum (HIFCS)            | บริษัท Cytiva จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)          |
| 12. Flow wash buffer (FWB)                               | บริษัท Beckman Coulter จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |

## 2. เครื่องมือ

### เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

- |  |  |
|--|--|
| 1. เครื่อง Flow cytometer รุ่น FC500                     | บริษัท Beckman Coulter จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)       |
| 2. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน<br>(Centrifuge)             | บริษัท ThermoScientific จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)      |
| 3. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย<br>(Microcentrifuge) | บริษัท Eppendorf จำกัด<br>(ประเทศเยอรมัน)                  |
| 4. เครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ<br>(Water bath)          | บริษัท Memmert จำกัด<br>(ประเทศเยอรมัน)                    |
| 5. เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ                      | บริษัท Horiba Medical จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา)        |
| 6. เครื่อง Vortex mixer                                  | บริษัท Scientific Industries จำกัด<br>(ประเทศสหรัฐอเมริกา) |

### 3. การออกแบบงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) ระยะเวลาการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2563 โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบจำเพาะเจาะจง คือ ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยรอรับการปลูกถ่ายอวัยวะที่ได้รับการคัดเลือกให้ทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC ตามเกณฑ์การจัดสรรอวัยวะของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย แล้วทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM และศึกษาเปรียบเทียบผลการทดสอบของแต่ละเทคนิค รวมถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการทดสอบ

### 4. วิธีการทดลอง

#### 4.1 ประชากรและลักษณะกลุ่มตัวอย่าง

น้ำเหลืองของผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรอปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตาย ที่ได้รับการคัดเลือกให้ทดสอบความเข้ากันได้ตามเกณฑ์การเลือกคนไข้เพื่อปลูกถ่ายไตกับผู้บริจาคไตสมองตาย ได้จากการปั่นแยกเลือดชนิด Clot blood ที่เจาะเก็บไม่เกิน 30 วัน นับจากวันที่เจาะถึงวันที่ทดสอบความเข้ากันได้ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส และตรวจความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2562 ถึง เดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2563 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย

คำนวณจำนวนตัวอย่างโดยวิธีการทางสถิติ โดยใช้สูตร Correlation Sample size (49)

$$C \text{ Total sample size} = N = [(Z_{\alpha} + Z_{\beta})/C]^2 + 3$$

เมื่อกำหนดให้  $\alpha$  = ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 (type I error)

กำหนดให้ที่ความเชื่อมั่น 95% ที่ระดับนัยยะสำคัญ 0.05

$\beta$  = ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 (type II error)

กำหนดอำนาจการทดสอบ (power) = 80%

$$\beta = 1 - \text{power of test} = 1 - 0.800 = 0.200$$

The standard normal deviate for  $\alpha$  =  $Z_{\alpha}$  = 1.960

The standard normal deviate for  $\beta$  =  $Z_{\beta}$  = 0.842

r = Estimating Effect Size = 0.200

$$C = 0.5 * \ln[(1+r)/(1-r)] = 0.203$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น} \quad N &= [(1.960+0.842)/0.203]^2+3 \\ &= 194 \end{aligned}$$

ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่ต้องการคืออย่างน้อย 194 ตัวอย่าง โดยเมื่อทำการคัดเลือกตัวอย่างตามเกณฑ์ พบว่ามีตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์การทดสอบจำนวน 199 ตัวอย่าง

เซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดลิมโฟไซต์ที่แยกจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของผู้บริจาคไตสมองตายภายใน 24 ชั่วโมงนับจากเวลาการผ่าตัดนำอวัยวะออกจากร่างกาย โดยเป็นผู้บริจาคไตสมองตายและตรวจความเข้ากันได้กับผู้ป่วยระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2563 ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย

น้ำเหลืองที่ทราบผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอสำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ตัวอย่างควบคุมผลลบ (Negative control serum, NC) ได้จากการรวมตัวอย่างน้ำเหลือง (Pooled serum) ผู้บริจาคเลือดเพศชาย หมู่เลือด AB ที่ให้ผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Solid phase immunoassays โดย Luminex® Pool antigen system หรือ Screening beads ให้ผลเป็นลบ ได้รับอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ตัวอย่างควบคุมผลบวก (Positive control serum, PC) ได้จากการรวมตัวอย่างน้ำเหลือง (Pooled serum) จากผู้ป่วยที่ผ่านการตรวจ HLA antibody แล้วมีผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอเป็นบวกมีค่า PRA มากกว่า 90% ได้รับอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

## 5. วิธีการศึกษาวิจัย

### 5.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Cell Isolation)

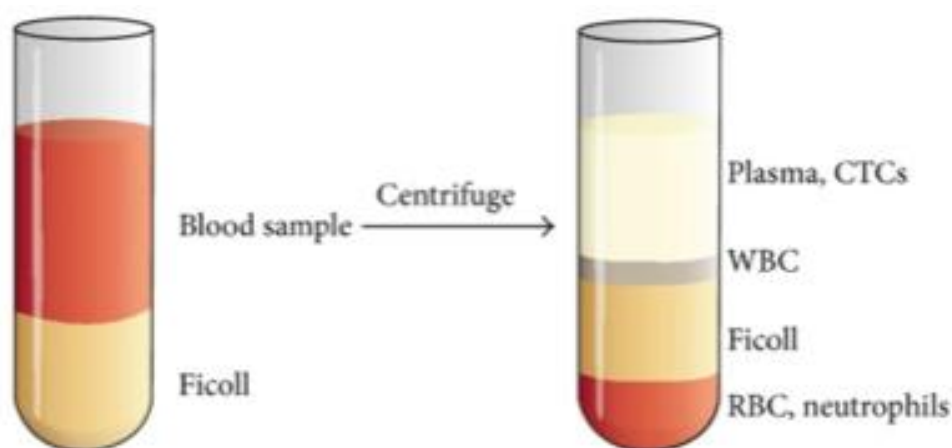
#### 5.1.1 การเตรียมเซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามหรือต่อมน้ำเหลือง

ในกรณีของม้าม หั่นม้ามขนาดกว้าง x ยาว ประมาณ 2 x 2 เซนติเมตร ใส่ลงใน 1XPBS ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ม้ามใส่หลอดพลาสติกกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตรแล้วเติมผงเหล็ก (Carbonyl iron) ผสมโดยกลับหลอดไปมา (Inverse mix) ด้วยเครื่อง test tube rotator เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำหลอดออกจากเครื่อง วางไว้เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ผงเหล็กตกตะกอน แล้วดูดส่วนสารน้ำด้านบน overlay บนน้ำยา Lymphoprep (Ficoll)

ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยให้แยกชั้นกับน้ำยา จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 800 g เบรก 0 เป็นเวลา 20 นาที ระหว่างรอปั่นแยกเซลล์ ให้เตรียมสารละลาย 20% (W/V) ซูโครส 10 มิลลิลิตร (ซูโครส 2 กรัม ใน 1XPBS 10 มิลลิลิตร) เมื่อปั่นแล้ว mononuclear cell จะแยกชั้น มีลักษณะเป็นวงแหวนอยู่ในชั้นน้ำยา (ภาพที่ 16) แยกเฉพาะส่วนเซลล์ด้วย glass pasture pipettes ขนาด 5 นิ้ว คูดใส่หลอดพลาสติกกันแหลมขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม 1XPBS จนครบ 13 มิลลิลิตร ปั่นล้างที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ผสมเซลล์กับ 1XPBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการแยกเกล็ดเลือดโดย underlay สารละลาย 20% ซูโครสปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้ glass pasture pipettes ขนาด 9 นิ้ว เติมสารละลาย 20% ซูโครสลงไปทีกันหลอด ปั่นแยกเกล็ดเลือด ที่ความเร็วรอบ 200 g เบรก 0 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นคูดชั้นเกล็ดเลือดและส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนตะกอนเซลล์ คูดใส่หลอดทดลองขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร แล้วเติม 1XPBS เพื่อปั่นล้าง 2 ครั้งด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที (11, 50)

ในกรณีของต่อมน้ำเหลือง ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตรและเข็มขนาดเบอร์ 21 แหวงเบาๆ รอบต่อมน้ำเหลืองแล้วฉีด 1XPBS เข้าไปภายในต่อมน้ำเหลือง เพื่อให้เซลล์ลิมโฟไซต์กระจายออกมา แล้วคูดสารละลายเซลล์ใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 12 x 75 มิลลิเมตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ถ้ามีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนให้กำจัดด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาปั่นล้างด้วย 1XPBS ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 1XPBS ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร (11)

### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 16 แสดงการแยก Mononuclear cells ด้วยน้ำยา Lymphoprep (Ficoll-hypaque; FH) (50)



### 5.1.2 การเตรียมเซลล์ทำปฏิกิริยากับ Pronase

ดูดสารละลายเซลล์ลิมโฟซัยต์ที่เตรียมไว้ โดยคำนวณปริมาตรที่ใช้ให้ได้ เซลล์จำนวน  $1-5 \times 10^6$  เซลล์ ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด  $12 \times 75$  มิลลิเมตร แล้วปั่นตกตะกอน ดูดสารน้ำออกทั้งหมด เติม 1XPBS ปริมาตร 800 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายเอนไซม์ Pronase ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ครบเวลาให้เติม HIFCS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารเอนไซม์ DNase ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 40 วินาที เมื่อครบเวลาให้เติม 1XPBS มิลลิลิตรที่แช่เย็นทันที โดยให้มีปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของหลอด แล้วปั่นล้าง 2 ครั้งด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เติม 1XPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจสอบความมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์และคำนวณ ปริมาตรที่จะใช้ในการทดสอบ (15)

### 5.1.3 ตรวจสอบ ความมีชีวิตของเซลล์ ด้วย tryphan-blue

ดูดเซลล์ลิมโฟซัยต์ในสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้ผสมกับสี tryphan-blue ในอัตราส่วน 1:1 เติมนลงใน Hemocytometer แล้วนับจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ แล้วประเมิน ความมีชีวิตของเซลล์ คิดเป็นร้อยละเซลล์ตายจะยอมติดสีน้ำเงินใต้กล้องจุลทรรศน์ (11)

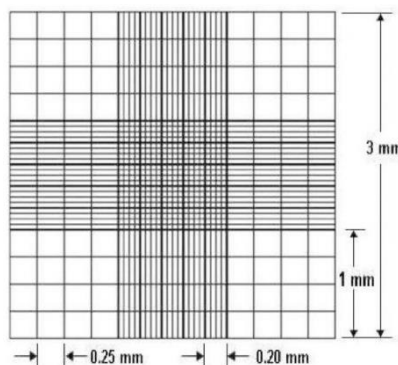
### 5.1.4 การนับเซลล์และคำนวณปริมาตรที่จะใช้ในหลุมปฏิกิริยา

นับเซลล์ด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ ( $B \times 10^3$ ) หรือ นับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer (ภาพที่ 17) โดยนับเซลล์จาก 5 ช่อง RBC chamber แล้วคำนวณจากวิธี (15)

$$\text{ปริมาตร RBC chamber 5 ช่อง} = 0.2 \times 0.2 \times 0.1 \times 5 = 0.02 \text{ mm}^3$$

$$\square \text{ ถ้าปริมาณเซลล์ ใน RBC chamber 5 ช่อง} = A \text{ เซลล์}$$

$$\text{ใน 1 ไมโครลิตรจะมีเซลล์อยู่} = A / 0.02 = B \times 10^3 \text{ เซลล์ต่อไมโครลิตร}$$



ภาพที่ 17 แสดงลักษณะขนาดของช่องนับเซลล์บน Hemocytometer (<https://www.slideshare.net/GovardhanJoshi/hemocytometer>)

## 5.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำเหลืองเพื่อใช้ในการทดสอบ

### 5.2.1 การเตรียมน้ำเหลืองจากเลือดครบส่วน

ปั่นแยกน้ำเหลืองจากเลือดครบส่วนที่ไม่มีสารกันเลือดแข็ง โดยทำการปั่นแยกจาก clotted blood ที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้ glass pasture pipette ขนาด 5 นิ้วดูดแยกส่วนน้ำเหลืองใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บน้ำเหลืองที่แยกแล้วที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทดสอบ

### 5.2.2 การละลายน้ำเหลืองที่แช่แข็ง

นำหลอดน้ำเหลืองแช่แข็งละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดส่วนใสไปทำการทดสอบ

### 5.2.3 การ Treat น้ำเหลืองด้วยสารละลาย DTT เพื่อทำลาย IgM

ใช้ autopipette ดูดสารละลาย DTT ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังปั่นน้ำเหลืองให้ดูดแยกส่วนใสปริมาตร 180 ไมโครลิตรด้วย autopipette เติมลงในหลอดที่มีสารละลาย DTT ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

## 5.3 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM (FCXM Optimization)

### 5.3.1 การตั้งค่าเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

ปรับตั้งค่าเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ให้เป็นค่าเริ่มต้นทั้งหมดก่อนเริ่มใช้งาน ทำการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคโตสมองตายจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองแล้วนำไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ โดยไม่ย้อมด้วยสารสี (Unstained cell) แล้วปรับตั้งค่า Compensate ของทุกช่องสัญญาณ (Chanel) ให้เป็น 0 และปรับความต่างศักย์ภายในเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ให้สามารถวัดเซลล์ลิมโฟไซต์ได้แล้วจึงสร้าง Gate บริเวณเซลล์ลิมโฟไซต์ที่เห็นในกราฟ จากนั้นใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ย้อมด้วย monoclonal antibody ครึ่งละ 1 สี วัดค่า FI เพื่อทำการตั้งค่า compensate ของแต่ละสี แล้วจึงเพิ่มสีที่ย้อมร่วมกันทีละสี สุดท้ายจึงทำการย้อมทุกสีรวมกันอีกครั้งเพื่อปรับความสมดุลของค่า compensate ไม่ให้มีสัญญาณรบกวนข้ามช่องสี

Monoclonal antibody ที่ย้อมและตรวจวัดได้แก่

- CD3 PE สำหรับตรวจวัดลิมโฟไซต์ชนิด T cell
- CD 19 PE cy5 สำหรับตรวจวัดลิมโฟไซต์ชนิด B cell
- IgG FIT C สำหรับตรวจ Human IgG ในตัวอย่าง

ทำการเตรียมเซลล์และย้อมเพื่อทำการปรับตั้งค่า จำนวน 5 ชุด ดังนี้

- Single Stain; CD3 PE
- Single Stain; CD19 PEcy5
- Single Stain; IgG FITC
- Double Stain; CD3 PE และ CD19 PE cy5
- Triple Stain ; CD3 PE, CD19 PE cy5 และ IgG FITC

### 5.3.2 การหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ที่เหมาะสม

ไตเตรตโดยใช้เซลล์ลิมโฟซัยต์ย้อมด้วย monoclonal antibody ที่ dilution ต่าง ๆ เช่น 0.05X, 0.2X, 0.4X, 0.6X, 0.8X, 1X โดยเริ่มจากปริมาตรที่กำหนดในเอกสาร ประกอบผลิตภัณฑ์ของน้ำยา อัตราส่วนที่เหมาะสมคือค่า dilution ที่วัดค่า FI แล้วให้อัตราส่วน ระหว่างผลบวกและลบสูงที่สุด

### 5.3.3 การหาค่า positive-negative cut off สำหรับการทดสอบ

ทดสอบ FCXM โดยใช้เซลล์ลิมโฟซัยต์ของผู้บริจาคไตสมองตาย กับตัวอย่าง ควบคุมลบ บันทึกค่า Median Channel Fluorescent (MCS) และคิดค่า Mean และ Standard Deviation (SD) ของ MCS เพื่อใช้กำหนดค่า Positive cutoff ของการทดสอบโดยพิจารณาค่าที่ SD ที่ทำให้ผลลบจากตัวอย่างควบคุมลบเป็นลบจริง

### 5.4 การทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM (Protocol Validation)

ทดสอบ FCXM ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยต์จากผู้บริจาคไตสมองตายที่ผ่านการตรวจแอนติเจน เอชแอลเอแล้วกับตัวอย่างน้ำเหลืองที่ผ่านการตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Single Antigen Beads จำนวน 20 ตัวอย่าง คำนวณความไวและความจำเพาะ Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) ของเทคนิคเทียบกับผล HLA แอนติบอดี โดยใช้สูตร

		VXM		
		Positive	Negative	
FCXM	Positive	ผลบวกจริง (True Positive; TP)	ผลบวกปลอม (False Positive; FP)	PPV = $TP/(TP+FP) \times 100$
	Negative	ผลลบปลอม (False Negative; FN)	ผลลบจริง (True Negative; TN)	NPV = $TN/(FN+TN) \times 100$
		ความไว = $TP/(TP+FN) \times 100$	ความจำเพาะ = $TN/(FP+TN) \times 100$	

## 5.5 ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

### 5.5.1 ใช้ข้อมูลการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC

ตัวอย่างซีรัมของผู้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายที่ได้รับการคัดเลือกให้ตรวจความเข้ากันได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดจะได้รับการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC ก่อนการปลูกถ่าย โดยทำการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์เป็นชนิด T และ B cell ด้วย Nylon wool แล้วปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้น 3000 เซลล์ต่อไมโครลิตรและตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการย้อมสี trypan blue โดยต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 จากนั้นทำการทดสอบ 2 ชุด กับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก และน้ำเหลืองของผู้รับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายทั้งตัวอย่างที่ผสมและไม่ผสม DTT มีการทดสอบเป็น dilution จำนวน 6 dilution คืออัตราส่วนเซลล์ต่อน้ำเหลืองเป็น 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 1:0.5 และ 1:0.25 และแยกการทดสอบเป็น 3 ชุดตามอุณหภูมิที่ใช้ขณะทำปฏิกิริยา คือที่ 4, 22 และ 37 องศาเซลเซียส

ชุดทดสอบด้วยเทคนิค CDC ทำการบ่มเซลล์กับน้ำเหลืองเป็นเวลา 60 นาที แล้วเติมคอมพลีเมนต์ ลงในทุกหลุมปฏิกิริยาหลุมละ 5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ครบเวลาเติมสารละลาย Eosin Y และสารละลาย 4% PFA ร้อยอย่างน้อย 40 นาทีแล้วอ่านผล

ชุดทดสอบด้วยเทคนิค AHG-CDC จะทำการบ่มเซลล์กับน้ำเหลืองเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Hank's Balances Salt Solution (HBSS) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปั่นที่ความเร็วรอบ 2200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที และเคาะเพทลงบนกระดาษเอนกประสงค์ ปั่นล้างจนครบ 3 ครั้ง เติมน้ำยา Anti Human Globulin หลุมละ 1 ไมโครลิตรจับเวลา

1 นาทีแล้วเติมคอมพลีเมนต์หลุมละ 5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที ครบเวลาเติมสารละลาย Eosin Y และสารละลาย 4% PFA อย่างน้อย 40 นาทีแล้วอ่านผล

ทำการอ่านผลและแปลผลตามเกณฑ์จาก ASHI Manual guideline (11, 14) โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ย้อมติดสีในหลุมปฏิกิริยา ถ้ามีจำนวนมากกว่าร้อยละ 20 ของเซลล์ทั้งหมดจะแปลผลเป็นบวก ให้คะแนนเซลล์ที่บวกตามเกณฑ์ในตารางที่ 3 เมื่ออ่านปฏิกิริยาครบทั้งชุดการทดสอบให้แปลผลระหว่างตัวอย่างน้ำเหลืองที่ผสมและไม่ผสม DTT ร่วมกันตามตารางที่ 4

### 5.5.2 ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค FCXM

เปิดเซลล์ลิมโฟไซต์ลงใน U plate 96 wells ที่เตรียมไว้โดยให้มีปริมาณเซลล์  $2.5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุมทดสอบ ผสมกับน้ำเหลืองปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นเติม FWB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปั่นล้างที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วสะบัดส่วนน้ำออกและซับด้วยกระดาษเอนกประสงค์ ทำการปั่นล้าง 3 ครั้ง แล้วเติม Antibody cocktail (ประกอบด้วย anti-CD3-CP5, anti-CD19-PE, anti-IgG-FITC และ PBS ปริมาตรตามอัตราส่วนที่ทำการหาไว้จากข้อ 5.3.2) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้าง 2 ครั้งแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย 1% PFA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer หากไม่วัดทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสในที่มืด และต้องวัดภายใน 24 ชั่วโมง (43)

### 5.5.3 เปรียบเทียบผลการตรวจระหว่าง 2 เทคนิค

นำผลที่ได้จากการทดสอบความเข้ากันได้ของทั้ง 2 เทคนิคมาเปรียบเทียบกัน ในกรณีที่พบว่ามีความแตกต่างกัน ให้ทำการวิเคราะห์หาสาเหตุของการเกิดผลแตกต่างกัน โดยการส่งตรวจเพิ่มเติม เช่น การตรวจระบุชนิดของ HLA antibody

### 5.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IBM SPSS Statistics Version 22.0. บริษัท ไอบีเอ็ม จำกัด นิวยอร์ก ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.6.1 วิเคราะห์ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลอายุผู้รับการปลูกถ่ายไต, จำนวน HLA Mismatch, ค่า PRA ของผู้รับการปลูกถ่ายไต และ ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบของแต่ละเทคนิค

5.6.2 เปรียบเทียบผลการตรวจความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC กับ FCXM โดยใช้สถิติ Chi-square test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ( $p\text{-value} < 0.05$ )

5.6.3 วิเคราะห์ผลความแตกต่างของผลการจัดสรรไตให้กับผู้ป่วยระหว่างการใช้เทคนิค FCXM และเทคนิค CDC-XM, AHG-CDC ด้วยสถิติเชิงพรรณนา

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM ใช้ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากผู้บริจาคไตสมองตาย ที่แยกจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลือง ทดสอบกับตัวอย่างน้ำเหลืองควบคุมลบ จำนวน 38 ตัวอย่าง

การทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM ใช้ตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากผู้บริจาคไตสมองตาย ที่แยกจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลือง ทำการทดสอบกับ ตัวอย่างน้ำเหลืองที่ผ่านการตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอด้วยเทคนิค Single Antigen Beads จำนวน 20 ตัวอย่าง

การทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ใช้ตัวอย่างเซลล์ของผู้ป่วยเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์จากผู้บริจาคไตสมองตาย ที่แยกจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลือง จำนวน 25 ตัวอย่าง ทดสอบกับตัวอย่างน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตที่ได้รับการคัดเลือกให้ตรวจความเข้ากันได้ตามเกณฑ์การคัดเลือกคนไข้ของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย และได้ทำการทดสอบความเข้ากันกับผู้บริจาคอวัยวะระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2563 จำนวน 199 ตัวอย่าง โดยมีอายุเฉลี่ย  $47.36 \pm 11.44$  ปี ในจำนวนนี้มีตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไต 59 ราย มีข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเกณฑ์การปลูกถ่ายไต ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลผู้ป่วยและตัวอย่างน้ำเหลืองตามเกณฑ์การจัดสรรไตที่นำมาทดสอบ (N=199)

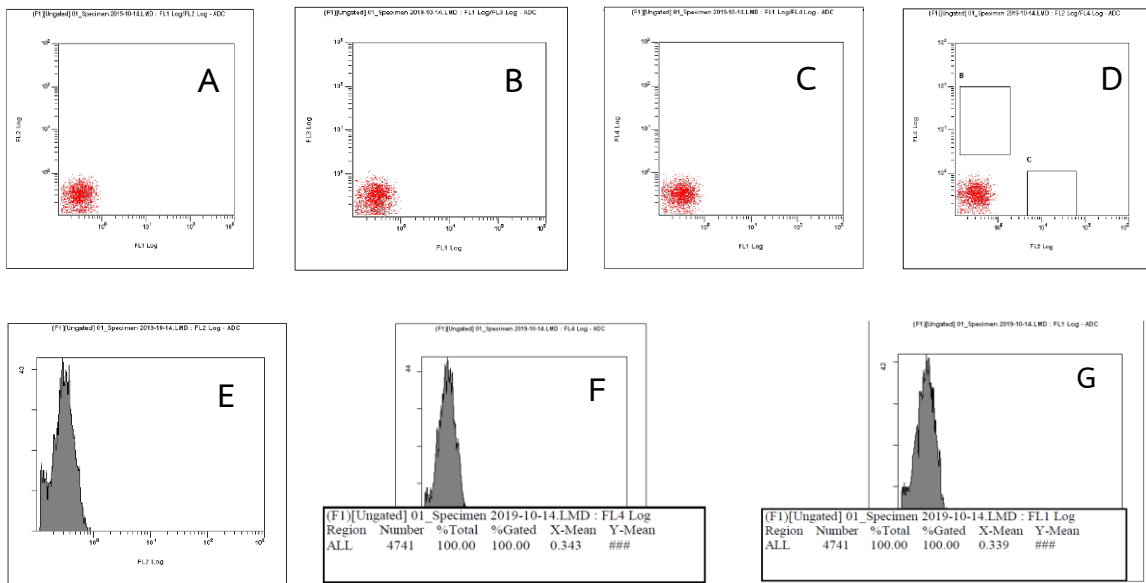
ข้อมูลผู้ป่วยตามเกณฑ์การจัดสรรไต	จำนวนผู้ป่วย (%)
HLA Mismatch (MM)	
- 0/6 ตำแหน่ง	2 (1.0%)
- 1/6 ตำแหน่ง	9 (4.5%)
- 2/6 ตำแหน่ง	54 (27.1%)
- 3/6 ตำแหน่ง	50 (25.1%)
- 4/6 ตำแหน่ง	46 (23.1%)
- 5/6 ตำแหน่ง	27 (13.6%)
- 6/6 ตำแหน่ง	7 (3.5%)
- No Data (Others organ)	4 (2.0%)

ข้อมูลผู้ป่วยตามเกณฑ์การจัดสรรไต	จำนวนผู้ป่วย (%)
ค่า % PRA	
- PRA = 0 %	131 (65.8%)
- PRA < 50%	37 (18.6%)
- PRA = 51-80%	11 (5.5%)
- PRA > 80%	11 (5.5%)
- No Data (Others organ)	9 (4.5%)
HLA Antibody ของผู้ป่วย	
- มี HLA Antibody ต่อ Class I	28 (14%)
- มี HLA Antibody ต่อ Class II	18 (8.5%)
- มี HLA Antibody ต่อ Class I และ II	14 (7.0%)
ตัวอย่างที่มี DSA	
- มี DSA ต่อ HLA Class I และ II	5 (2.5%)
- มี DSA ต่อ HLA Class II	4 (2.0%)

## 2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM

### 1. การตั้งค่าเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)

วัดเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคไตสมองตายจากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ โดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ไม่ย้อมด้วยสารสี (Unstained cell) ภายใต้สภาวะที่ปรับตั้งค่า Compensate ทั้งหมดเป็น 0 จากนั้นทำการปรับความต่างศักย์ภายในเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ให้สามารถตรวจจับเซลล์ลิมโฟไซต์ได้ มีกลุ่มเซลล์แสดงในกราฟ log ชนิด dot-plot และสัญญาณจากทุกช่องสัญญาณจะต้องเป็นลบแสดงถึงกลุ่มเซลล์ที่ตรวจจับได้แต่ไม่ติดสี พิจารณาจากกราฟ log ชนิด dot-plot แสดงเซลล์ที่ตรวจวัดได้อยู่ในค่าไม่เกิน 100 ทั้งแกน X และ Y และกราฟชนิดฮิสโตแกรม แสดงพื้นที่กราฟอยู่ในค่าไม่เกิน 100 ทั้งแกน X และ Y ในทุกช่องสัญญาณ



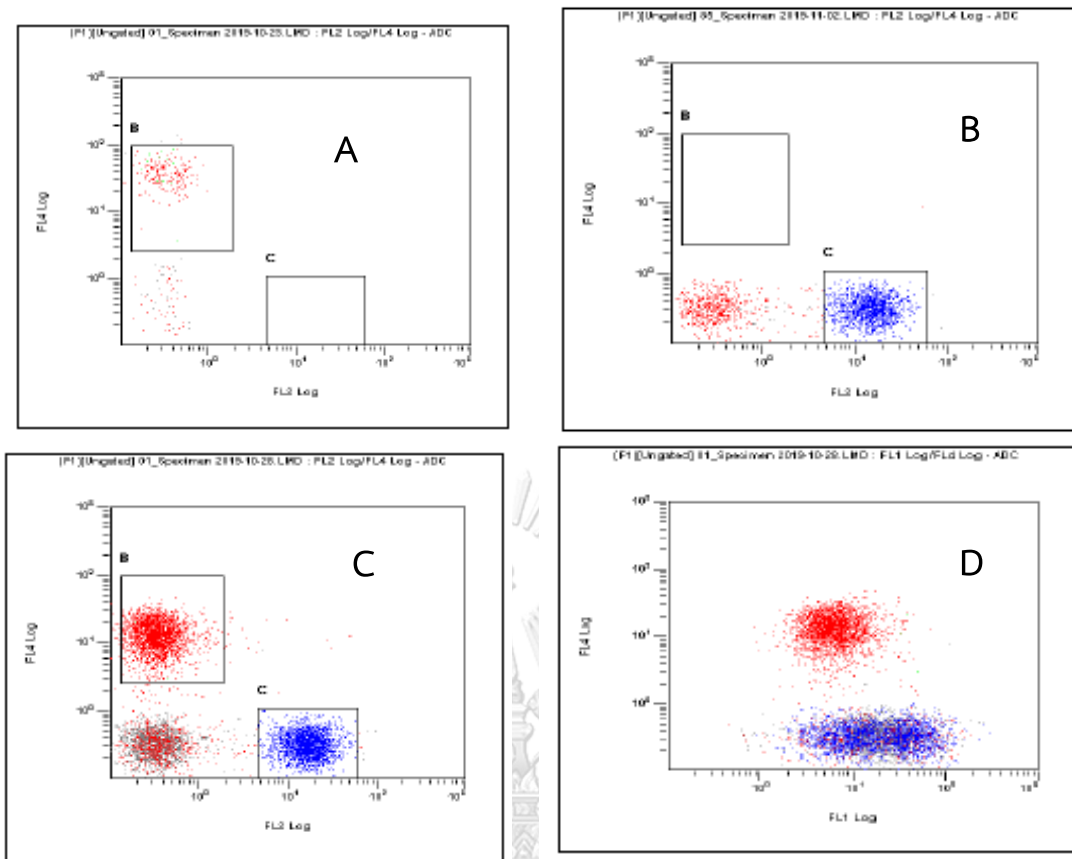
**ภาพที่ 18** แสดงกราฟชนิดดอท-พล็อตจากเครื่องโฟลวไซโตเมทรีขณะปรับตั้งค่าการตรวจวัด  
 A-D แสดงกราฟ log ชนิด dot-plot จากเครื่องโฟลวไซโตมิเตอร์ แสดงกลุ่มเซลล์จากแต่ละ  
 ช่องสัญญาณที่ตรวจวัดได้ โดยเซลล์ทั้งหมดแสดงสัญญาณอยู่ในค่าไม่เกิน  $10^0$  ทั้งแกน X และ Y  
 E-G แสดงกราฟชนิดฮิสโตแกรม แสดงพื้นที่กราฟอยู่ในค่าไม่เกิน  $10^0$

เมื่อนำเซลล์ลิมโฟซัยต์ไปย้อมด้วย monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ แล้ววัดค่า Florescent Intensity (FI) โดยเตรียมเซลล์และย้อมเพื่อปรับตั้งค่า compensate ทำการเตรียมเซลล์และย้อมเพื่อทำการปรับตั้งค่า จำนวน 5 ชุด ดังนี้

- Single Stain; CD3 PE
- Single Stain; CD19 PEcy5
- Single Stain; IgG FITC
- Double Stain; CD3 PE และ CD19 PE cy5
- Triple Stain ; CD3 PE, CD19 PE cy5 และ IgG FITC

โดยในการทดสอบที่ย้อมสีเดียว กราฟจะแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เฉพาะในช่องสัญญาณตรวจวัดของสีที่ทดสอบอยู่เท่านั้น สังเกตและปรับค่า compensate ทุกช่องสัญญาณให้ตรงกับสีที่ย้อม หากพบการข้ามกันของสัญญาณในช่องสัญญาณอื่น (Spill over) ให้ปรับค่า compensate เพิ่มเพื่อหักลบสัญญาณจนกว่าจะหมด จากนั้นจึงย้อมและวัดสีถัดไป แล้วจับคู่สีย้อมร่วมกัน และสุดท้ายจึงย้อมทั้ง 3 สีรวมกัน โดยกราฟของเซลล์ตัวอย่างที่ตรวจวัดได้ในแต่ละชุดจะแสดงผลตามภาพที่ 19





ภาพที่ 19 ภาพแสดงกราฟการย้อมสีเซลล์ลิมโฟไซต์เพื่อแยกชนิดของเซลล์โดยเครื่องฟลูออไรโดเมทรี

A แสดงกราฟ log ชนิดdot-pot ของเซลล์ที่ย้อม Single stain CD3

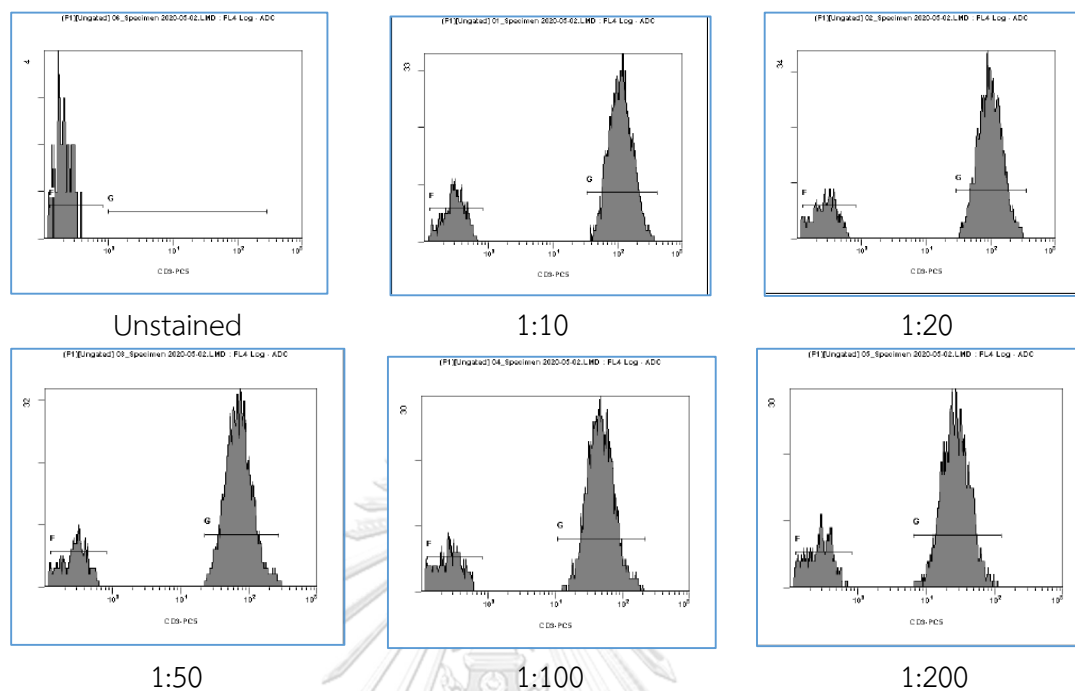
B แสดงกราฟ log ชนิดdot-pot ของเซลล์ที่ย้อม Single stain CD19

C แสดงกราฟ log ชนิดdot-pot ของเซลล์ที่ย้อม Double stain CD3 และ CD19

D แสดงกราฟ log ชนิดdot-pot ของเซลล์ที่ย้อม Triple Stain CD3, CD19 และ IgG

2. การหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ทำการไตเตรตโดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ย้อมด้วย monoclonal antibody โดยการย้อม CD 3 และ CD19 ทำที่ dilution 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 และ 1:200 ส่วนการย้อม IgG ทำที่ dilution 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 และ 1: 800 แล้วนำค่า FI ของเซลล์ที่ย้อมติดสี และไม่ติดสีคิดเป็นอัตราส่วน (Ratio) เพื่อเลือกปริมาณแอนติบอดีที่สามารถแยกเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสีออกจากกันได้มากที่สุด

## 2.1 การไตเตรท Anti CD3 PE/Cy5



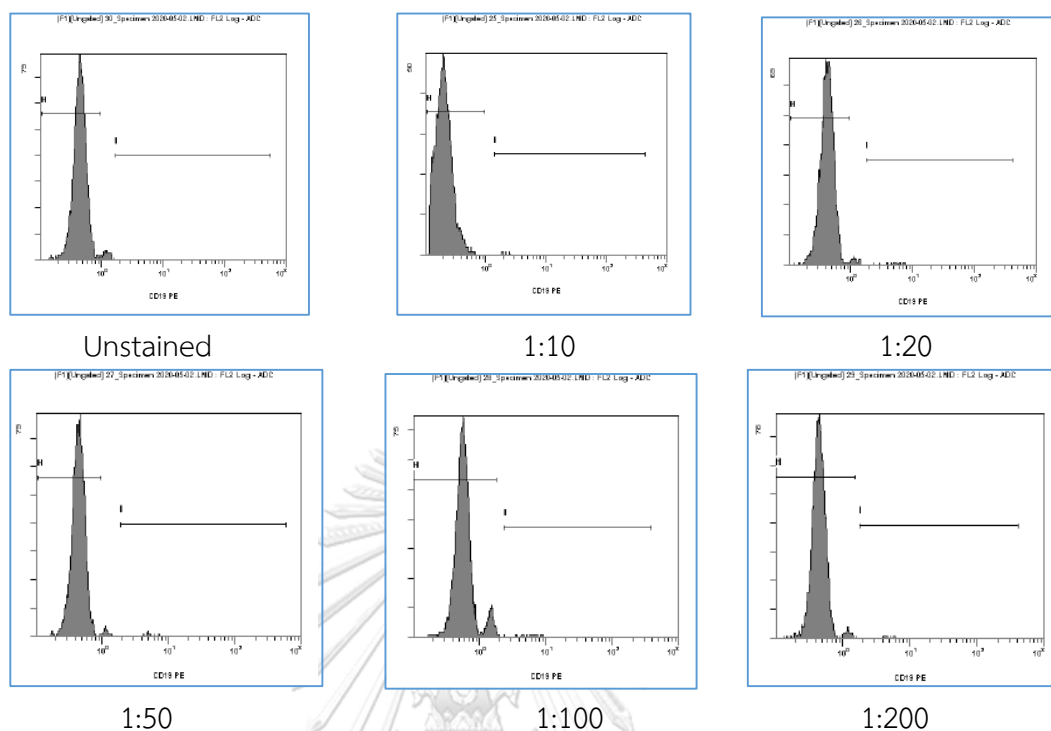
ภาพที่ 20 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T cell ที่ใช้ Anti CD3 PE/Cy5 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ทำการทดสอบหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อลิมโฟไซต์ชนิด T cell ด้วยแอนติบอดีต่อ CD3 ที่ ติดฉลากด้วยสี PE/Cy5 ซึ่งตรวจจับได้ที่ช่องสัญญาณ FL4 จะได้กราฟ Histogram ของสัญญาณดังภาพที่ 20 และเมื่อคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างเซลล์ที่ย้อมติดสี และไม่ติดสีคิตดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า อัตราส่วนที่แยกกลุ่มเซลล์ออกจากกันได้ดีที่สุดคือ 1:20

ตารางที่ 7 แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T cell ที่ใช้ Anti CD3 PE/Cy5 ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dilution	MFI Positive	MFI Negative	Ratio
Unstained	309.9	734.7	2.37
1:10	333.6	700.2	2.09
<b>1:20</b>	<b>312.6</b>	<b>682.5</b>	<b>2.18</b>
1:50	306.2	645.0	2.10
<b>1:100</b>	293.6	587.7	2.00
1:200	309.9	434.7	1.40

## 2.2 การไตเตรท Anti CD19 PE



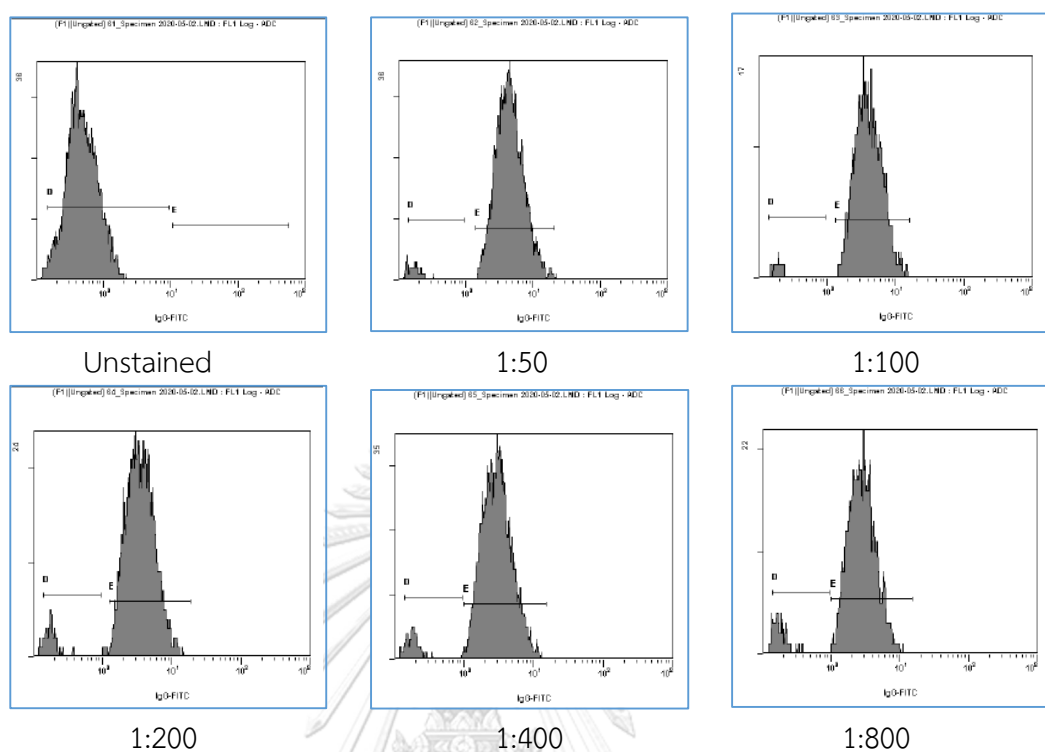
ภาพที่ 21 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B cell ที่ใช้ Anti CD19 PE ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ทำการทดสอบหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อลิมโฟไซต์ชนิด B cell ด้วยแอนติบอดีต่อ CD19 ที่ ติดฉลากด้วยสี PE ซึ่งตรวจจับได้ที่ช่องสัญญาณ FL2 จะได้กราฟ Histogram ของสัญญาณดังภาพที่ 21 และเมื่อคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างเซลล์ที่ย้อมติดสี และไม่ติดสีคิตดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า อัตราส่วนที่แยกกลุ่มเซลล์ออกจากกันได้ดีที่ที่สุดคือ 1:10

ตารางที่ 8 แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด B cell ที่ใช้ Anti CD19 PE ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dilution	MFI Positive	MFI Negative	Ratio
Unstained	203.1	410.9	2.02
<b>1:10</b>	<b>203.0</b>	<b>416.0</b>	<b>2.04</b>
1:20	221.2	407.5	1.84
1:50	204.1	349.7	1.71
1:100	185.7	352.0	1.89
1:200	203.1	409.9	2.02

### 2.3 การไตเตรท Anti IgG FITC



ภาพที่ 22 แสดงกราฟ Histogram ของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จากการย้อม Anti Human IgG ที่ติดฉลากด้วย FITC

ทำการทดสอบหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ Human IgG ด้วยแอนติบอดีต่อ Human IgG ที่ติดฉลากด้วยสี FITC ซึ่งตรวจจับได้ที่ช่องสัญญาณ FL1 จะได้กราฟ Histogram ของสัญญาณดังภาพที่ 22 และเมื่อคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างเซลล์ที่ย้อมติดสี และไม่ติดสีคิตดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า อัตราส่วนที่แยกกลุ่มเซลล์ออกจากกันได้ดีที่สุดคือ 1:100

ตารางที่ 9 แสดงค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการย้อมย้อม Anti Human IgG ที่ติดฉลากด้วย FITC ที่ความเข้มข้นต่างกัน

Dilution	MFI Positive	MFI Negative	Ratio
Unstained	616.0	171.1	3.60
1:50	418.1	78.8	5.30
<b><u>1:100</u></b>	<b><u>404.1</u></b>	<b><u>73.9</u></b>	<b><u>5.47</u></b>
1:200	391.0	73.9	5.29
1:400	372.9	76.1	4.90
1:800	367.8	78.3	4.70

3. การหาค่า positive-negative cut off สำหรับการทดสอบ โดยใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ทดสอบ กับน้ำเหลืองควบคุมลบ(Negative control) จำนวน 38 ตัวอย่าง แล้วบันทึกค่า MCF จากนั้นคำนวณ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ช่วงต่างๆ เพื่อนำไปใช้ทดสอบกับน้ำเหลืองที่ตรวจ HLA Antibody และกำหนดค่า cut-off ดังแสดงในตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** แสดงค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับต่างๆ ของค่า LINEAR X-Median จากค่าMCS ในการทดสอบลิมโฟไซต์ชนิด T cell และ B cell กับน้ำเหลืองควบคุมลบจำนวน 38 ตัวอย่าง

	T cell	B cell
Mean	127.78	192.10
1SD	1.26	71.26
1.5SD	1.89	106.89
2SD	2.53	142.52
3SD	3.79	213.79
3.5SD	4.41	249.41

### 3. ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM

ทดสอบ FCXM ระหว่างเซลล์ลิมโฟไซต์จากผู้บริจาคไตสมองตายที่ผ่านการตรวจแอนติเจน เอชแอลเอแล้วกับตัวอย่างน้ำเหลืองที่ผ่านการตรวจชนิดของ HLA Antibody ด้วยเทคนิค Single Antigen Beads บันทึกค่า MCF และคิดค่า Median Channel Fluorescent Shift (MCFS) โดยนำ ค่า MCF ของการทดสอบลบด้วย MCF ของ NC ในชุดทดสอบเดียวกัน จากนั้นใช้ค่า SD ที่คำนวณได้ เป็นค่า cut-off ในการแปลผลเปรียบเทียบกับ DSA ของ HLA Antibody ในตัวอย่าง ดังแสดงใน ตารางที่ 11 โดยเป็นตัวอย่างที่มี DSA ต่อ HLA Antigen Class I จำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่มี DSA ต่อ HLA Antigen Class II จำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่มี DSA ต่อ HLA Antigen Class I และ II จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่มี HLA Antigen แต่ไม่เป็น DSA จำนวน 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่มี HLA Antibody จำนวน 4 ตัวอย่าง

**ตารางที่ 11** แสดงค่า MCFS ของการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยต์ผู้บริจาคไตสมอง ตายกับตัวอย่างน้ำเหลืองที่ตรวจชนิดของ HLA Antibody แล้วแปลผลด้วยค่า cutoff ที่ SD ต่างๆ

Test No.	T cell FCXM				B cell FCXM				HLA antibody	
	MCFS	cutoff 2SD	cutoff 3SD	cutoff 3.5SD	MCFS	cutoff 2SD	cutoff 3SD	cutoff 3.5SD	DSA Class I	DSA Class II
CK1	8.98	Pos	Pos	Pos	104.71	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg
CK2	1.03	Neg	Neg	Neg	123.89	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Neg	<b>Pos</b>
CK3	60.07	Pos	Pos	Pos	214.27	Pos	Pos	<b>Neg</b>	Pos	<b>Pos</b>
CK4	20.90	Pos	Pos	Pos	250.15	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
CK5	272.84	Pos	Pos	Pos	307.09	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
CK6	2.02	Neg	Neg	Neg	399.05	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos
CK7	135.88	Pos	Pos	Pos	242.79	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
CK8	-2.06	Neg	Neg	Neg	-11.78	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK9	-1.02	Neg	Neg	Neg	-22.19	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	Neg	<b>Pos</b>
CK10	0.00	Neg	Neg	Neg	358.01	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos
CK11	-2.06	Neg	Neg	Neg	-117.98	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK12	-1.02	Neg	Neg	Neg	-15.14	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK13	2.08	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	26.85	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>
CK14	1.04	Neg	Neg	Neg	-68.16	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK15	2.08	Neg	Neg	Neg	12.18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK16	4.0	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	-55.66	Neg	Neg	Neg	<b>Neg</b>	Neg
CK17	2.0	Neg	Neg	Neg	-37.82	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK18	1.0	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	114.37	Neg	Neg	Neg	<b>Pos</b>	Neg
CK19	-3.0	Neg	Neg	Neg	90.01	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK20	-3.10	Neg	Neg	Neg	-99.00	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

จากการทดสอบเพื่อตั้งค่าเครื่องโฟลไซโตเมทรี และการหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody จากนั้นนำสภาวะดังกล่าวมาทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยต์ของผู้บริจาคไตสมองตาย จำนวน 38 ตัวอย่างกับน้ำเหลือง NC แล้วนำค่า MCF ที่วัดได้มาทำการคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) ที่ 1SD 2SD 3SD และ 3.5SD เพื่อนำไปใช้เป็นค่า Positive-Negative cutoff สำหรับแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ

โดยใช้พิจารณาเลือกค่า cutoff ที่สอดคล้องกับผล VXM สำหรับ T cell พิจารณาค่าที่ 2SD คือ 2.53 ค่าที่ 3SD คือ 3.79 และค่าที่ 3.5SD = 4.41 ในส่วนของค่า cutoff สำหรับ B cell ที่ 2SD คือ 142.52 ค่าที่ 3SD คือ 213.79 และ 3.5SD = 249.47 เมื่อทำการแปลผลการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอล เอพบว่าการใช้ค่า cutoff ที่ 2SD และ 3SD ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดให้ผลไม่แตกต่างกันทั้ง 20 ตัวอย่าง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผล VXM พบว่าทั้ง 2 ค่า cutoff สำหรับ T cell มีความสอดคล้องกัน 17 ตัวอย่าง ส่วน B cell มีความสอดคล้องกัน 18 ตัวอย่าง แต่เมื่อพิจารณาค่า cutoff ที่ 3.5SD พบว่าใน T cell ผลจะมีความสอดคล้องกันจำนวน 18 ตัวอย่าง ส่วน B cell จะมีจำนวนผลที่สอดคล้องกันลดลง เป็น 17 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 12

**ตารางที่ 12** แสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค FCXM กับ VXM โดยแยกพิจารณา T cell และ B cell

Technique	Result ที่ 2SD และ 3SD		Result ที่ 3.5SD	
	T cell	B cell	T cell	B cell
VXM + / FCXM + (TP)	5	6	5	5
VXM - / FCXM + (FP)	1	0	0	0
VXM + / FCXM - (FN)	2	2	2	3
VXM - / FCXM - (TN)	12	12	13	12
Total	20	20	20	20

เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจความเข้ากันได้อีกครั้ง เลือกเฉพาะตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจไม่สอดคล้องกัน ระหว่าง VXM และ FCXM ทั้ง 5 ตัวอย่างไปทำการทดสอบซ้ำด้วยเทคนิค AHG-CDC พบว่าทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยมาจากกลุ่ม T cell 2 ตัวอย่างและ B cell 2 ตัวอย่างที่มีผลเป็นลบปลอมโดยเทคนิค FCXM และใช้ cutoff เท่ากับ 2SD และ 3SD เมื่อเทียบกับ VXM พบว่าผลการทดสอบด้วยเทคนิค AHG-CDC เป็นลบ สอดคล้องกับผลจากเทคนิค FCXM แต่ตัวอย่างที่ให้ผล VXM - / FCXM + จำนวน 1 ตัวอย่างให้ผล AHG-CDC สอดคล้องกับผล VXM คือยืนยันการเป็นผลบวกปลอมของเทคนิค FCXM ส่วน 1 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบปลอมในกลุ่ม B cell เมื่อใช้ค่า cutoff ที่ 3.5SD ให้ผล AHG-CDC เป็นบวกดังแสดงในตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** แสดงผล DSA และผลการเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค AHG-CDC ในกลุ่มตัวอย่างที่ผล VXM ไม่สอดคล้องกับ FCXM

Sample	VXM-DSA		FCXM		AHG-CDC	
	Class I	Class II	T cell	B cell	T cell	B cell
CK2 ; FN ใน B cell ที่ 2SD และ 3SD	Neg	Pos (DR13 = 6878)	Neg	Neg	Neg	Neg
CK9 ; FN ใน B cell ที่ 2SD และ 3SD	Neg	Pos (DR4 = 2925)	Neg	Neg	Neg	Neg
CK13 ; FN ใน Tcell ที่ 2SD และ 3SD	Pos (B44 = 1236)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK16 ; FP ใน T cell ที่ 2SD และ 3SD	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg
CK18 ; FN ใน Tcell ที่ 2SD และ 3SD	Pos (A11 = 1710)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CK3 ; FN ใน B cell ที่ 3.5SD	Pos (B38 = 18886)	Pos (DQ5 = 12979)	Pos	Neg	Pos	Pos

ค่า cutoff ที่ให้ผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM ที่มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค VXM ประกอบกับเทคนิค AHG-CDC คือ กลุ่ม T cell ใช้ค่า cutoff ที่ 3.5SD (MCS  $\geq$  4.41) และ B cell ที่ 3SD (MCS  $\geq$  213.79) แล้วประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค FCXM โดยคิดค่าความไว ความจำเพาะของการทดสอบ โดยแยกกลุ่ม T cell และ B cell พบว่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบใน T cell เท่ากับร้อยละ 71 และ 100 ตามลำดับ ส่วน B cell มีความไวเท่ากับร้อยละ 75 และความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อคิดค่า Positive predictive value (PPV) และ Negative predictive value (NPV) ของการทดสอบพบว่า ในกลุ่ม T cell มีค่า PPV เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 86 และ B cell มีค่า PPV เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 85 ดังแสดงในตารางที่ 14 และตารางที่ 15

เมื่อนำผลการทดสอบความเข้ากันได้ของทั้ง 2 เทคนิคไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square test พบว่า การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค FCXM ทั้งในกลุ่ม T cell และ B cell มีความสัมพันธ์กับการพิจารณาความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค VXM อย่างมีนัยยะทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p$ -value = 0.001 และ 0.008)



**ตารางที่ 14** แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ T cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค VXM และ FCXM

T cell		VXM		
		Positive	Negative	
FCXM	Positive	5	0	$PPV = TP/(TP+FP)$ $= 5 / (5+0)$ $= 100\%$
	Negative	2	13	$NPV = TN/(FN+TN)$ $= 13 / (2+13)$ $= 86\%$
		ความไว = $TP/(TP+FN)$ $= 5 / (5+2)$ $= 71\%$	ความจำเพาะ = $TN/(FP+TN)$ $= 13 / (13+0)$ $= 100\%$	

**ตารางที่ 15** แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ B cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค VXM และ FCXM

B cell		VXM		
		Positive	Negative	
FCXM	Positive	6	0	$PPV = TP / (TP+FP)$ $= 6 / (6+0)$ $= 100\%$
	Negative	2	12	$NPV = TN / (FN+TN)$ $= 12 / (2+12)$ $= 85\%$
		ความไว = $TP/(TP+FN)$ $= 6 / (6+2)$ $= 75\%$	ความจำเพาะ = $TN/(FP+TN)$ $= 12 / (0+12)$ $= 100\%$	

#### 4. ผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ในกลุ่มตัวอย่าง

ทำการทดสอบ FCXM ในผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ ด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC แล้วโดย สำหรับ T cell ใช้ค่า cutoff ที่ 3.5SD และ B cell ใช้ค่า cutoff ที่ 3SD พบว่ามีจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างผล AHG-CDC และ FCXM โดยแบ่งเป็นผลในกลุ่ม T cell จำนวน 7 ตัวอย่าง และ B cell จำนวน 2 ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 16

**ตารางที่ 16** แสดงค่า MCS และผลการทดสอบ FCXM ของตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันเมื่อเทียบกับผล CDC และ AHG-CDC

No.	Result No.	CDC, AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
1	SER016	Neg	Neg	5.12	Pos	-34.03	Neg
2	SER055	Neg	Neg	5.17	Pos	-26.16	Neg
3	SER058	Neg	Neg	6.18	Pos	-18.19	Neg
4	SER074	Neg	Neg	5.17	Pos	63.02	Neg
5	SER077	Neg	Neg	7.18	Pos	13.03	Neg
6	SER080	Neg	Neg	5.17	Pos	0.94	Neg
7	SER083	Neg	* IgM	-2.06	Neg	249.01	Pos
8	SER197	* IgM	** IgG	5.85	Pos	526.87	Pos
9	SER199	Neg	** IgG	-2.06	Neg	51.15	Neg

\* IgM = Positive IgM type , \*\*IgG = Positive IgG type

จากผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับเทคนิค FCXM ที่ไม่สอดคล้องกัน เมื่อพิจารณาแยกกันระหว่าง T cell และ B cell พบว่าในจำนวน 9 ตัวอย่าง ทั้ง 7 ตัวอย่างในกลุ่ม T cell เป็นผล CDC, AHG-CDC - / FCXM + คือเป็นผลบวกปลอมของเทคนิค FCXM ทั้งหมด ส่วน B cell มี 1 ตัวอย่างที่แสดงผลเป็นผลบวกปลอม และอีก 1 ตัวอย่าง แสดงผลเป็น CDC, AHG-CDC + / FCXM - คือเป็นผลลบปลอมของ FCXM ดังแสดงในตารางที่ 17

**ตารางที่ 17** แสดงจำนวนของผลการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM เมื่อพิจารณาแยกกันระหว่าง T cell และ B cell

	T cell	B cell
CDC, AHG-CDC + / FCXM + (TP)	0	11
<b>CDC, AHG-CDC - / FCXM + (FP)</b>	<b>7</b>	<b>1</b>
CDC, AHG-CDC + / FCXM - (FN)	0	1
CDC, AHG-CDC - / FCXM - (TN)	192	186
Total	199	199

พิจารณาผล HLA Antibody ในตัวอย่างที่ให้ผลตรวจความเข้ากันได้ไม่สอดคล้องกันระหว่างเทคนิค CDC และ AHG-CDC ทั้งหมด โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมในกลุ่ม T cell จากจำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่าเป็นตัวอย่างที่ไม่มี HLA Antibody จำนวน 5 ตัวอย่าง มี HLA Antibody แต่ไม่เป็น DSA จำนวน 1 ตัวอย่าง และมี DSA ที่ค่า MFI = 2888 จำนวน 1 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 18

**ตารางที่ 18** แสดงข้อมูลของตัวอย่างในกลุ่ม T cell ให้ผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC และ AHG-CDC ไม่สอดคล้องกับเทคนิค FCXM

No.	Result No.	PRA Class I	Antibody Identification	DSA	CDC Result T cell	FCXM MCS T cell
1	SER016	0	-	No DSA	N	5.1
2	SER055	0	-	No DSA	N	5.2
3	SER058	0	-	No DSA	N	6.2
4	SER074	0	-	No DSA	N	5.2
5	SER077	12	B44, B45, B76	No DSA	N	7.2
6	SER080	0	-	No DSA	N	5.2
7	SER197	71	A31, B42, B56, B71, B76, B81	<b>A31</b> (MFI = 2888)	N	5.9

ส่วนกลุ่ม B cell ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมจำนวน 1 ตัวอย่างพบว่าเป็นตัวอย่างที่ไม่มี HLA Antibody ส่วนอีก 1 ตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอมพบว่าเป็นตัวอย่างที่มี HLA Antibody แต่ไม่เป็น DSA ดังแสดงในตารางที่ 19

**ตารางที่ 19** แสดงข้อมูลของตัวอย่างในกลุ่ม B cell ให้ผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC และ AHG-CDC ไม่สอดคล้องกับเทคนิค FCXM

No.	Result No.	PRA Class I	PRA Class II	Antibody Indentification	DSA	CDC B cell	MCS B cell
1	SER083	0	0	-	No DSA	IgM	249.01
2	SER138	0	20	DR16, DP3	No DSA	IgG	51.10

พิจารณาผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC กับ FCXM ในกลุ่มตัวอย่างที่มี DSA หรือให้ผล VXM เป็นบวก จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่าในกลุ่มที่มี DSA ต่อเอชแอลเอ class I จำนวน 5 ตัวอย่าง ในการทดสอบของ T cell ผล CDC และ AHG-CDC ให้ผลเป็นลบ และไม่สอดคล้องกับ VXM ทั้งหมด คือไม่สามารถตรวจจับ HLA Antibody ที่เป็น DSA ในตัวอย่างได้ แต่ผลการทดสอบจากเทคนิค FCXM สามารถตรวจจับและให้ผลบวกได้จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนการทดสอบใน B cell ในกลุ่มตัวอย่างที่มี DSA ต่อเอชแอลเอ class II จำนวน 4 ตัวอย่าง และมี DSA ต่อเอชแอลเอ class I และ class II จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าผลจากเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM ให้ผลสอดคล้องกับ VXM ทั้งหมด คือสามารถตรวจจับ DSA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 20

**ตารางที่ 20** แสดงข้อมูลผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM เปรียบเทียบกับผล VXM ในกลุ่มตัวอย่างที่มี DSA

No.	Result No.	HLA Antibody: DSA (MFI)		CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		Class I	ClassII	T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
1	SER151	-	DQ5 (3490)	IgM	IgG	0.0	Neg	319.0	Pos
2	SER153	B75 (9382)	DQ5 (7928)	IgM	IgG	-1.0	Neg	337.9	Pos
3	SER169	-	DR15 (2471), DR51 (2437)	Neg	IgG	2.1	Neg	314.0	Pos
4	SER174	-	DR15 (2471), DQ4 (2897)	Neg	IgG	0.0	Neg	248.8	Pos
5	SER180	A30 (1783)	DR14(12430), DR52 (10024)	Neg	IgG	4.1	Neg	510.0	Pos
6	SER185	-	DR15 (9159), DR51 (8889)	Neg	IgG	1.0	Neg	488.8	Pos
7	SER187	A30 (2037), B18 (2099)	DR14 (6918), DR52 (10009)	IgM	IgG	3.1	Neg	577.0	Pos
8	SER193	A31 (1998)	DR12(12357), DR52 (10024)	Neg	IgG	1.0	Neg	526.9	Pos
9	SER197	<b>A31 (2888)</b>	DR12 (9573), DR52 (10009)	IgM	IgG	5.9	<b>Pos</b>	526.9	Pos

### 5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของเทคนิค FCXM ในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยทดสอบเทียบกับผลการทดสอบความเข้ากันได้จากเทคนิค CDC, AHG-CDC พบว่า กลุ่ม T cell ไม่สามารถคำนวณความไวและ PPV ได้เนื่องจากไม่มีตัวอย่างในกลุ่ม T cell เป็นบวกโดยเทคนิค CDC, AHG-CDC แต่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ และ NPV ได้เท่ากับร้อยละ 96 และร้อยละ 100 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 21 ส่วน B cell เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC กับเทคนิค FCXM พบว่ามีค่าความไวร้อยละ 91 ความจำเพาะร้อยละ 99 ส่วนค่า PPV เท่ากับร้อยละ 91 และค่า NPV เท่ากับร้อยละ 99 ดังแสดงในตารางที่ 22

**ตารางที่ 21** แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ T cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM

T cell		CDC และ AHG-CDC		
		Positive	Negative	
FCXM	Positive	0	7	PPV = TP/(TP+FP) = 0/ (7+0) XXXXXXXXXX
	Negative	0	192	NPV = TN/(FN+TN) = 192/ (0+192) = 100%
		ความไว = TP/(TP+FN) = 0 / (0) XXXXXXXXXX	ความจำเพาะ = TN/(FP+TN) = 192 / (7+192) = 100%	

**ตารางที่ 22** แสดงการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ PPV และ NPV ของ B cell เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC และ FCXM

B cell		CDC และ AHG-CDC		
		Positive	Negative	
FCXM	Positive	11	1	PPV = TP / (TP+FP) = 11 / (11+1) = 91%
	Negative	1	186	NPV = TN / (FN+TN) = 186/(186+1) = 99%
		ความไว = TP/(TP+FN) = 11 / (11+1) = 91%	ความจำเพาะ = TN/(FP+TN) = 186/(186+1) = 99%	

ผลการวิเคราะห์ผลการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอเทคนิคต่างๆ โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 22.0)

เมื่อนำผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC กับเทคนิค FCXM ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square test พบว่า การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค ในกลุ่ม T cell ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ เนื่องจากผลการทดสอบของกลุ่มเทคนิค CDC และ AHG-CDC ทั้งหมดในกลุ่มตัวอย่างเป็นลบ ส่วนกลุ่ม B cell พบว่าการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค CDC และ AHG-CDC มีความสัมพันธ์กับการพิจารณาความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค FCXM อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p\text{-value} = 0.000$ ) และเมื่อนำผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM กับผล VXM ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square test พบว่าทั้งในกลุ่ม T cell และ B cell มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p\text{-value} = 0.049$  และ 0.000 ตามลำดับ) ทั้งสองกลุ่ม

วิเคราะห์ผลความแตกต่างของผลการจัดสรรไตให้กับผู้ป่วยระหว่างการใช้เทคนิค เทคนิค CDC-XM, AHG-CDC และ FCXM พิจารณาจากผลการทดสอบความเข้ากันได้ของผู้ป่วยที่ทั้ง 2 กลุ่มให้ผลไม่สอดคล้องกัน จำนวน 9 ตัวอย่าง โดย 8 ตัวอย่างผลเปลี่ยนแปลงจากเดิมเป็นลบ กลายเป็นบวก ทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่ได้รับการจัดสรรไตหากใช้เทคนิค FCXM คิดเป็น 4.02% และ 1 ตัวอย่างผลเปลี่ยนแปลงจากบวกด้วยเทคนิค CDC, AHG-CDC เป็นลบจะเป็นผู้ที่ได้รับการจัดสรรไตคิดเป็น 0.50 %

## 6. เปรียบเทียบเวลาที่ใช้ทำการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM

เนื่องจากการทดสอบความเข้ากันได้สำหรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคไตสมองตายจัดเป็นกรณีเร่งด่วนที่ต้องออกผลให้รวดเร็วที่สุด เพื่อรักษาสภาพอวัยวะให้สมบูรณ์นำไปใช้ปลูกถ่ายให้ได้ผลดีที่สุดต่อผู้ป่วย เมื่อทำการเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ทดสอบระหว่างเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM พบว่าเทคนิค FCXM ใช้เวลาเฉลี่ยในการทดสอบน้อยกว่าเนื่องจากขั้นตอนในการทดสอบมีน้อยกว่า ดังแสดงในตารางที่ 23 โดยระยะเวลาในการทดสอบของเทคนิค FCXM จะใช้เวลาทดสอบคิดเป็น 54.38% ของระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC

**ตารางที่ 23** แสดงเวลาและขั้นตอนของการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค CDC และ AHG- CDC กับ เทคนิค FCXM

ขั้นตอนในการทดสอบ	CDC และ AHG-CDC		FCXM	
	วิธีทำงาน	เวลาเฉลี่ย (นาที)	วิธีทำงาน	เวลาเฉลี่ย (นาที)
การเตรียมตัวอย่าง	<ul style="list-style-type: none"> <li>- หยิบและละลายตัวอย่างทดสอบ</li> <li>- Treated ตัวอย่างด้วย DTT</li> <li>- เตรียมตัวอย่างลงในเพลทสำหรับทำการทดสอบ</li> </ul>	123	<ul style="list-style-type: none"> <li>- หยิบและละลายตัวอย่างทดสอบ</li> <li>- Treated ตัวอย่างด้วย DTT</li> </ul>	94
การเตรียมเซลล์ทดสอบ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การเตรียมเซลล์ทดสอบในปริมาณมากสำหรับใส่คอลัมน์แยกชนิดของเซลล์</li> <li>- แยกเซลล์เป็น T และ B cell</li> <li>- นับและปรับเซลล์เพื่อทดสอบ</li> </ul>	121	<ul style="list-style-type: none"> <li>- แยกเซลล์ระดับ Total Lymphocytes</li> <li>- Treated cell ด้วย Pronase Enzyme</li> <li>- นับและปรับเซลล์เพื่อทดสอบ</li> </ul>	63
การทดสอบความเข้ากันได้	<ul style="list-style-type: none"> <li>- บ่มเซลล์กับซีรัม</li> <li>- ล้างเซลล์และเติม AHG สำหรับชุดการทดสอบ AHG-CDC</li> <li>- เติมคอมพลิเมนต์</li> <li>- บ่มเซลล์กับคอลพลีเมนต์</li> <li>- หยุดปฏิกิริยา</li> <li>- อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์</li> </ul>	372	<ul style="list-style-type: none"> <li>- บ่มเซลล์กับซีรัม</li> <li>- ล้างเซลล์</li> <li>- ย้อมเซลล์ด้วย Monoclonal</li> <li>- ล้างเซลล์</li> <li>- วัดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Flow cytometer</li> </ul>	178
	รวม	616		335



## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลอง

#### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจ FCXM

การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ ด้วยเทคนิค FCXM เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถตรวจจับแอนติบอดีที่ความเข้มข้นน้อยๆ ในตัวอย่างได้ (4, 12, 51) จึงจำเป็นต้องมีการปรับตั้งค่าและสภาวะต่างๆ อย่างเหมาะสมในแต่ละห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง มีความไวและความจำเพาะที่เหมาะสมตรงกับวัตถุประสงค์การใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ (52, 53) จากการทดสอบเพื่อตั้งค่าเครื่องโพลไซโตเมทรี และการหาอัตราส่วนของ monoclonal antibody ที่เหมาะสม โดยใช้เซลล์ลิมโฟซัยต์จากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของผู้บริจาคไตสมองตาย จำนวน 10 ตัวอย่าง ในการปรับตั้งเครื่องและไตเตรท monoclonal antibody โดยจะทำการพิจารณาจากค่าอัตราส่วนระหว่างสัญญาณของเซลล์ที่ติดสี และไม่ติดสี ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือความเข้มข้นที่ทำให้สามารถจำแนกสัญญาณของเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสีออกจากกันได้มากที่สุด เมื่อนำค่าเฉลี่ยสัญญาณสีจากตัวอย่างทั้งหมดมาคิดค่าเฉลี่ย และหาอัตราส่วนพบว่าความเข้มข้นของ Anti CD3 PE/cy5 ที่สามารถจำแนกเซลล์ที่ให้ผลบวกและลบออกจากกันได้ดีที่สุดคือที่ความเข้มข้น 1: 20 ส่วน Anti CD19 PE ที่ความเข้มข้น 1:10 และ Anti IgG FITC ที่ความเข้มข้น 1:100 จากนั้นทดสอบเพื่อหาค่า cutoff ในการแปลผล จากการศึกษาพบว่าค่า cutoff ที่แต่ละห้องปฏิบัติการใช้มีความหลากหลาย โดยมากคือ MCS อยู่ในช่วง 2SD ถึง 3SD จากค่าเฉลี่ย (11, 43, 44, 52-54) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบเซลล์ลิมโฟซัยต์จากผู้บริจาคอวัยวะสมองตายกับตัวอย่างน้ำเหลือง NC จำนวน 38 ตัวอย่าง แล้วนำค่า MCF ที่วัดได้มาทำการคำนวณค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยศึกษาตั้งแต่ระดับ 1SD - 3.5SD แล้วนำไปใช้เป็นค่า Positive-Negative cutoff สำหรับแปลผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอ

#### 2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพเทคนิค FCXM

ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอในตัวอย่างเซลล์กับน้ำเหลืองที่ทราบผลเอชแอลเอแอนติเจนและเอชแอลเอแอนติบอดี จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่าสำหรับ T cell การใช้ค่า cutoff ที่ 3.5SD จะสามารถแปลผลโดยไม่มีผลบวกปลอมเมื่อเทียบกับผล VXM แต่พบผลลบปลอมจำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาจากผลทดสอบความเข้ากันได้จากเทคนิค AHG-CDC พบว่าเป็นไปตามผลของเทคนิค FCXM โดยตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม (VXM + / FCXM -) พบว่า HLA Antibody ในน้ำเหลือง

ทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่า MFI ของแอนติบอดีที่เป็น DSA เท่ากับ 1236 และ 1710 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Weak antibody ที่การตรวจความเข้ากันได้อาจไม่สามารถตรวจจับได้ โดยระดับของแอนติบอดีในกลุ่มนี้ หากเป็นผู้ป่วยจะอยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงแต่สามารถปลูกถ่ายไตได้ (11) ส่วน B cell เลือกค่า cutoff ที่สอดคล้องกับผล VXM ที่สุด คือที่ 3SD โดยทำการแปลผลการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอทั้ง 20 ตัวอย่าง พบว่า 2 ตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม (VXM + / FCXM -) พิจารณาค่า MFI ของแอนติบอดีที่เป็น DSA ในตัวอย่างเท่ากับ 2925 และ 6878 แต่เมื่อเทียบกับผลทดสอบด้วยเทคนิค AHG-CDC พบว่าสอดคล้องกับ FCXM คือให้ผลเป็นลบ ดังนั้นหากประเมินจากค่า MFI ร่วมกับผลการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอโดยเทคนิค AHG-CDC ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ประกอบกับการศึกษานี้ต้องการลดความไวของเทคนิค FCXM เพื่อนำไปใช้ทดแทนเทคนิค CDC และ AHG-CDC ดังนั้นสถานะสำหรับการทดสอบและค่า cutoff ของเทคนิค FCXM ในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถนำไปใช้ทดสอบต่อในกลุ่มผู้ป่วยได้ โดยมีค่าความไวและความจำเพาะของการทดสอบ ใน T cell เท่ากับร้อยละ 71 และ 100 ตามลำดับ ส่วน B cell มีความไวเท่ากับร้อยละ 75 และความจำเพาะร้อยละ 100 เมื่อคิดค่า PPV และ NPV ของการทดสอบ กลุ่ม T cell มีค่า PPV เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 86 และ B cell มีค่า PPV เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 85

### 3. การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM ในกลุ่มตัวอย่าง

การทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอที่ประเทศไทยใช้อยู่ในปัจจุบันคือเทคนิค CDC และ AHG-CDC โดยผลการทดสอบความเข้ากันได้ที่เป็นบวกเนื่องจากแอนติบอดีชนิด IgG นับเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไต เนื่องจากในการศึกษาต่างๆ มีหลักฐานอย่างชัดเจนว่าผลบวกดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการปฏิเสธไต (7) ส่วนเทคนิค FCXM ที่มีความไวกว่าได้ถูกนำมาศึกษาและปรับใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอและได้รับการยืนยันว่ามีความสัมพันธ์กับการสูญเสียอวัยวะในระยะแรกหลังการปลูกถ่าย แต่ด้วยความไวที่สูงเกินไปส่งผลให้ในผู้ป่วยบางรายมีผลการทดสอบความเข้ากันได้เป็นบวกแต่แอนติบอดีที่ตรวจจับได้กลับไม่พบความสัมพันธ์ทางคลินิก และไม่แสดงความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของอวัยวะที่ลดลงในระยะยาวด้วย (31, 53) จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอระหว่างผู้บริจาคอวัยวะสมองตายกับตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วย จำนวน 199 ตัวอย่าง โดยทั้งหมดเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับการคัดเลือกผู้ป่วยรอรับไตของศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย และได้รับการตรวจความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC แล้ว เมื่อนำผลการทดสอบของแต่ละเทคนิคมาทำการเปรียบเทียบกัน พบว่าผลการตรวจส่วนมากจากเทคนิค CDC และ AHG-CDC กับ FCXM มีความสอดคล้องกัน โดยมีจำนวนตัวอย่างที่

ให้ผลไม่สอดคล้องกัน 9 ราย แบ่งเป็นผลจาก T cell จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่ให้ผลเป็น CDC,AHG-CDC - / FCXM + (FP) ทั้งหมดและ B cell จำนวน 2 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็น CDC,AHG-CDC - / FCXM + (FP) จำนวน 1 ตัวอย่างและอีก 1 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น CDC,AHG-CDC + / FCXM - (FN) พิจารณาผลแอนติบอดีในตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่างพบว่า 8 ตัวอย่างไม่มี DSA ต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบและมี DSA ต่อเอชแอลเอ class I จำนวน 1 ตัวอย่างซึ่งอยู่ในกลุ่ม FP ของ T cell แสดงว่าผลบวกจากเทคนิค FCXM ไม่ใช่ผลบวกปลอมเมื่อเทียบกับผล VXM ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันที่เป็นผลลบปลอมใน B cell จำนวน 1 ตัวอย่างนั้น ผล CDC,AHG-CDC ที่บวกอาจเกิดจากแอนติบอดีอื่นที่ไม่ใช่แอนติบอดีต่อเอชแอลเอ หรือเป็นผลบวกปลอมของเทคนิค CDC,AHG-CDC จากปัจจัยอื่นในการทดสอบได้ ส่วนตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผล CDC,AHG-CDC - / FCXM + (FP) ในกลุ่ม T cell จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ไม่มี DSA อาจเป็นผลบวกจากแอนติบอดีกลุ่มอื่น ที่ไม่ใช่เอชแอลเอ (11, 12, 53, 54) และอีก 1 ตัวอย่างของ B cell พบว่าในการทดสอบด้วยเทคนิค CDC,AHG-CDC มีผลเป็นบวกกับแอนติบอดีชนิด IgM ดังนั้นเทคนิค FCXM ที่ให้ผลเป็นบวกอาจเกิดจากการรบกวนปฏิกิริยาของ IgM ในตัวอย่างที่ถูกทำลายไม่หมดได้ และตัวอย่างดังกล่าวได้มีการตรวจติดตามหลังการปลูกถ่ายด้วยและยังไม่พบแอนติบอดีที่เป็น DSA ต่อเอชแอลเอของผู้บริจาค

จากกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้ พบว่ามีผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายไตจำนวน 59 ราย ในจำนวนนี้พบว่ามีผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มที่มีผลไม่สอดคล้องกันได้รับการปลูกถ่ายจำนวน 2 ราย โดยเป็นผู้ป่วยในกลุ่ม T cell มีผล CDC,AHG-CDC เป็นลบ แต่ FCXM เป็นบวก 1 ราย และ B cell ที่ผล CDC,AHG-CDC เป็นลบ แต่ FCXM เป็นบวก 1 ราย แต่ที่ระยะเวลาการปลูกถ่ายไม่เกิน 1 ปี ยังไม่พบรายงานว่ามีการปฏิเสธอวัยวะที่เกิดจากแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ ดังนั้นแสดงว่าความไวและความจำเพาะของเทคนิค CDC และ AHG-CDC เดิมยังสามารถป้องกันการปฏิเสธอวัยวะในกลุ่ม Hyperacute rejection ได้ดี รวมถึงเป็นข้อสังเกตว่าถึงแม้จะปรับลดความไวของเทคนิค FCXM ให้มีผลใกล้เคียงกับเทคนิค CDC และ AHG-CDC แล้ว แต่ก็ยังมีการพบผลบวกปลอมที่ไม่สอดคล้องกับผลการปลูกถ่ายในระยะไม่เกิน 1 ปีแรกของการปลูกถ่าย

วิเคราะห์กลุ่มตัวอย่าง 199 ตัวอย่างพบว่าจำนวน 131 ตัวอย่างคิดเป็น 65.8% มีค่า %PRA เป็น 0 คือตรวจไม่พบเอชแอลเอแอนติบอดีในตัวอย่าง ทำให้เมื่อทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอพบว่าให้ผลลบเป็นส่วนใหญ่ และไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ T cell ในกลุ่มตัวอย่างเลย โดยมีตัวอย่างที่มี DSA ต่อเอชแอลเอของผู้บริจาคจำนวน 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างที่มี DSA ต่อเอชแอลเอ Class II เท่านั้นจำนวน 5 ราย และมี DSA ต่อเอชแอลเอทั้ง 2 คลาส จำนวน 4 ราย โดยใน 4 ตัวอย่างที่มี

DSA ต่อเอชแอลเอทั้ง 2 คลาส พบว่าในช่วง MFI 1783-2099 ของแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ class I การทดสอบความเข้ากันได้ของทั้ง 3 เทคนิคไม่สามารถตรวจจับได้ แต่มี 1 ตัวอย่างที่ค่า MFI เท่ากับ 2888 ซึ่งเทคนิค CDC, AHG-CDC ให้ผลลบ ขณะที่เทคนิค FCXM ให้ผลบวก เนื่องจากความไวของเทคนิคที่สูงกว่า ส่วนกลุ่มของ DSA ต่อเอชแอลเอ class II ทุกตัวอย่างมีค่า MFI อยู่ในช่วง 2437 - 12430 โดยค่า MFI ต่ำสุดในกลุ่มนี้พบว่าต่ำกว่า MFI ต่ำสุดที่ของกลุ่มตัวอย่างน้ำเหลืองที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพ จากการทดสอบครั้งนี้อาจเกิดจากในบางตัวอย่างมีแอนติบอดีที่เป็น DSA มากกว่า 1 ตัว ทำให้มีการเสริมฤทธิ์กัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลให้ค่า MFI ของ DSA ไม่สัมพันธ์กับผล FCXM ว่าเกิดจาก 1. ความหนาแน่นของแอนติเจนที่เคลือบบนปดส์ของการตรวจ SAB มีความไม่เท่ากัน และ 2. การขัดขวางปฏิกิริยาของ IgM ทำให้แอนติบอดีชนิด IgG เข้าทำปฏิกิริยาได้น้อยกว่าความเป็นจริง และอาจมีความเกี่ยวข้องกับแอนติบอดีในโลคัสอื่นด้วยเช่น HLA-C (11, 12, 53, 54)

จากการศึกษาของ Kothathong K. และคณะทำการเปรียบเทียบผลการตรวจจาก 3 เทคนิค คือ CDC, AHG-CDC, พบว่า FCXM มี Sensitivity ที่ดีกว่า AHG CDC 4-6 เท่า และมากกว่า CDC 8-32 เท่า(14) ต่อมาในปี.ศ. 2012 Kupatawintu P. และคณะได้รายงานการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจความเข้ากันได้ของเทคนิคทั้ง 3 และพิจารณาความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอดของอวัยวะที่ 1 ปี และ 5 ปี พบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC กับ FCXM มีผลไม่สอดคล้องกัน 38 % โดยเมื่อเทียบกับอัตราการเกิดการปฏิเสธไตในปีแรกและผล DSA จะนับเป็นผลบวกปลอม 35.9% (15) ส่วนการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบกับสถานะของการทดสอบด้วยเทคนิค FCXM ที่ปรับปรุงใหม่เทียบกับผล CDC ร่วมกับ AHG-CDC พบว่าผลที่ไม่สอดคล้องกันลดลง คือมีผลที่ไม่สอดคล้องกันจำนวน 9 รายจาก 199 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.52 % เท่านั้น ซึ่งผลการทดสอบความเข้ากันได้ที่เปลี่ยนไป จะส่งผลต่อการจัดสรรไตให้กับผู้ป่วยด้วย แต่เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างไม่มีตัวอย่างที่มี DSA เฉพาะเอชแอลเอ class I และไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค CDC, AHG-CDC ใน T cell เลยส่งผลให้ไม่สามารถคำนวณค่าความสัมพันธ์ทางสถิติในกลุ่มของ T cell ได้ และไม่สามารถคำนวณค่าความไว และ PPV ได้ด้วย โดยค่าความจำเพาะที่คำนวณได้ คือ ร้อยละ 96 และมีค่า NPV เท่ากับร้อยละ 100 ส่วน B cell สามารถคำนวณค่าได้ทั้งหมด โดยมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 91 และร้อยละ 99 ตามลำดับ ส่วน PPV และ NPV เท่ากับร้อยละ 91 และร้อยละ 99 เช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC กับ FCXM พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p\text{-value} = 0.000$ ) และเมื่อนำผลการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM กับผล VXN ไปวิเคราะห์ด้วยสถิติ

Chi-square test พบว่าทั้งในกลุ่ม T cell และ B cell มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $p$ -value = 0.049 และ 0.000 ตามลำดับ)

สำหรับการตรวจความเข้ากันได้ของเทคนิค FCXM นี้ไม่เพียงแต่แสดงให้เห็นว่ามีความไวที่สูงขึ้นในการตรวจจับแอนติบอดีที่เป็น DSA เท่านั้น สภาวะที่นำมาใช้ทดสอบในการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าใช้ระยะเวลาในการทดสอบลดลงอย่างชัดเจน คือสามารถลดระยะเวลาลงเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยใช้เวลาในการทดสอบความเข้ากันได้หนึ่งครั้งนาน 335 นาทีคิดเป็น 54% ของระยะเวลาเฉลี่ยของการทดสอบด้วยเทคนิค CDC และ AHG-CDC หากสามารถนำมาใช้งานในการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างผู้ป่วยกับผู้บริจาคอวัยวะสมองตายจะช่วยลดระยะเวลาของการทดสอบก่อนการปลูกถ่าย และนำไปปลูกถ่ายได้เร็วขึ้น อีกทั้งการทดสอบด้วยเทคนิค FCXM ใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจคน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค CDC และ AHG-CDC ที่ต้องแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ให้เป็น T cell และ B cell โดยใช้คอลัมน์เส้นใยไนลอน (Nylon wool Column) จะต้องใช้ปริมาณเซลล์ต่อการทดสอบความเข้ากันได้ 1 ชุด กับผู้ป่วย 8 ราย ประมาณ  $3 \times 10^7$  เซลล์ส่วนเทคนิค FCXM จะใช้เซลล์ประมาณ  $5-10 \times 10^6$  เท่านั้น ทำให้มีโอกาสมากขึ้นในการบริหารจัดการให้สามารถนำส่งตัวอย่างต่อม้ามเนื้อที่มีปริมาณเซลล์เพียงพอต่อการทำการทดสอบได้ก่อนทำการผ่าตัดนำอวัยวะออก ช่วยลดระยะเวลาในการรอผลก่อนการปลูกถ่ายนำไปสู่การลดระยะเวลา Cold Ischemic Time (CIT) คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาอวัยวะที่จะนำไปปลูกถ่าย โดยจะนับตั้งแต่เริ่มต้นฉีดน้ำยารักษาอวัยวะที่เย็นเข้าสู่ระบบการไหลเวียนของเหลวในไตจนกระทั่งไตถูกนำไปปลูกถ่ายและระบบไหลเวียนเลือดกลับมาทำงานปกติอีกครั้ง (55) จากรายงานในปีค.ศ. 2015 ของ Claudio E. P. ว่าระยะเวลา CIT ที่นานขึ้นจะส่งผลให้เกิดภาวะการทำงานของไตช้าหลังการปลูกถ่าย (Delayed graft function; DGF) ซึ่งมักก่อให้เกิดความสับสนกับการตรวจคัดแยกภาวะการปฏิเสธไตในระยะแรก และความเสียหายของไตที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของไตสั้นลง (47, 56) ดังนั้นการลดระยะเวลา CIT ให้สั้นลงได้จะช่วยให้อัตราการอยู่รอดของไตสมบูรณ์สำหรับปลูกถ่ายมีมากขึ้น

ในการนำเทคนิค FCXM ไปใช้แทนการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอแทนเทคนิคเดิมนอกจากต้องคำนึงถึงปัจจัยด้านประสิทธิภาพของการทดสอบแล้ว ยังจำเป็นต้องคำนึงถึงต้นทุนในการทดสอบด้วย เพื่อไม่ให้เป็นภาระผลกระทบต่อผู้ป่วยที่เข้ารับบริการ โดยจากการพิจารณาต้นทุนในส่วนของน้ำยาและอุปกรณ์สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเทคนิค CDC, AHG-CDC กับ FCXM ในการศึกษาสำหรับการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอในผู้บริจาคไต 1 ราย กับผู้ป่วยที่

ได้รับคัดเลือกจำนวน 8 ราย พบว่า ต้นทุนน้ำยามีความใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเทคนิคโฟลวไซโตเมทรีใช้น้ำยาในการทดสอบที่น้อยกว่า รวมถึงเป็นน้ำยาที่มีบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายหลากหลาย ทำให้โอกาสในการเลือกใช้และการแข่งขันราคาในท้องตลาดมีสูงกว่าน้ำยาที่ใช้ในเทคนิค CDC, AHG-CDC ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเทคนิคการตรวจจึงไม่ส่งผลกระทบต่อต้นทุนและค่าบริการที่ต้องเรียกเก็บจากผู้ป่วย แต่การเปลี่ยนเทคนิคจำเป็นต้องมีการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ทั้งในด้านการปฏิบัติงานในการทดสอบ และการแปลผล ถึงแม้ว่าข้อดีของเทคนิค FCXM ในการแปลผลคือมีค่า cutoff ที่แน่นอน ตรวจวัดได้ แต่ในการปฏิบัติงานยังคงต้องเฝ้าระวังความเสี่ยงในด้านความชำนาญ และการแก้ไขปัญหาในการทดสอบของผู้ปฏิบัติงานด้วย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอล เอก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะด้วยเทคนิค FCXM โดยทำการทดสอบสภาวะที่ปรับตั้งค่าโดยทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยต์จากม้ามหรือต่อมน้ำเหลืองของผู้บริจาคไตสมองตายกับตัวอย่าง น้ำเหลืองที่ทราบผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอ จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแล้วนำสภาวะที่ผ่านการประเมินแล้วไปทดสอบในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคสมองตายที่ได้รับการคัดเลือกให้ทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอจำนวน 199 ตัวอย่างแล้วประเมินผลการทดสอบเทียบกับผลจากเทคนิค CDC-XM และ AHG-CDC เพื่อพัฒนาไปใช้ทดแทนเทคนิคเดิม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคในตัวอย่างน้ำเหลืองที่ทราบผลการตรวจแอนติบอดีต่อเอชแอลเอพบว่า ความไวและความจำเพาะของการทดสอบสำหรับกลุ่ม T cell มีค่าเท่ากับร้อยละ 71 และ 100 ตามลำดับ และ B cell พบว่าความไวและความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 75 และความจำเพาะร้อยละ 100 โดยมี ค่า PPV ในกลุ่ม T cell เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 86 และ B cell มีค่า PPV เท่ากับร้อยละ 100 ค่า NPV เท่ากับร้อยละ 85 อีกทั้งสภาวะดังกล่าวให้ผลการตรวจที่สัมพันธ์กับผลการตรวจความเข้ากันได้แบบจำลอง (VXM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนำสภาวะการทดสอบที่ปรับปรุงแล้วไปทดสอบกับตัวอย่างผู้ป่วย พบว่าผลการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM ให้ผลที่มีความสอดคล้องกับเทคนิค CDC และ AHG-CDC จำนวน 190 ตัวอย่างจาก 199 ตัวอย่าง คิดเป็น 95.47% มีอัตราการเกิดผลบวกปลอมจำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.0% และผลการทดสอบระหว่าง 2 กลุ่มเทคนิคมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่มีตัวอย่างที่สามารถเป็นตัวแทนของการตรวจความเข้ากันได้ของเอชแอลเอในกลุ่ม T cell ที่ให้ผลบวก และไม่มีตัวอย่างที่มีผลเอชแอลเอแอนติบอดีต่อเอชแอลเอแอนติเจน class I เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าความไว และค่า PPV รวมถึงไม่สามารถประเมินความสัมพันธ์ทางสถิติในกลุ่มตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ของเอชแอลเอด้วยเทคนิค FCXM ในกลุ่ม T cell พบว่ามีความจำเพาะร้อยละ 96 และ NPV เท่ากับร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับเทคนิค CDC และ AHG-CDC ส่วน B cell พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 91 และร้อยละ 99 ตามลำดับ ส่วน PPV และ NPV เท่ากับร้อยละ 91 และร้อยละ 99 เช่นเดียวกัน ดังนั้นจากการประเมินสภาวะการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยเทคนิค FCXM ในการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าเป็นสภาวะที่มีความไวและความจำเพาะเหมาะสมที่จะนำไปทดลองใช้ทดแทนเทคนิค CDC และ AHG-CDC ที่ใช้อยู่เดิม คือมีความไวในการ

ตรวจจับแอนติบอดีต่อเอชแอลเอที่จำเพาะต่อแอนติเจนของผู้บริจาคโดยไม่ก่อให้เกิดผลบวกปลอมในการทดสอบ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างอย่างจำเพาะในกลุ่มที่มีแอนติบอดีต่อเอชแอลเอแอนติเจนให้มากขึ้น ก่อนทำการประเมินอีกครั้งเพื่อนำไปใช้ทดแทนในการทดสอบจริง รวมถึง ก่อนการเปลี่ยนแปลงจะต้องมีการวางระบบการฝึกอบรมและประเมินเจ้าหน้าที่ก่อนเข้าปฏิบัติงาน ควรมีการจัดเก็บข้อมูลการทดสอบไว้เป็นกรณีศึกษาและเป็นแนวทางในการตัดสินใจแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นขณะปฏิบัติงานต่อไปในอนาคตด้วย ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงและป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดจากความไม่ชำนาญของผู้ปฏิบัติงานเมื่อเปลี่ยนเทคนิคการทดสอบใหม่





## บรรณานุกรม

1. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE. 2016;11(7):e0158765.
2. ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ. รายงานประจำปี 2561 ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ[Internet]. 2561[cited 2019 31 05]. Available from: <https://www.organdonate.in.th/assets/files/odc2561.pdf>
3. สมาคมปลูกถ่ายอวัยวะแห่งประเทศไทย. รายงานข้อมูลการปลูกถ่ายอวัยวะ ประจำปี 2560. [Internet]. 2561[cited 2019 3105]. Available from: [http://transplantthai.org/upload/180928123608887\\_MNB.pdf](http://transplantthai.org/upload/180928123608887_MNB.pdf)
4. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR, Adams RJ, Breggia AC, Paris PA, et al. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. Transplantation. 1990;49(3):527-35.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. [electronic resource]: Philadelphia : Saunders/Elsevier, c2012.7<sup>th</sup> ed.; 2012.
6. รัชณี โอเจริญ และ ภาวินี คุปตวิณฑุ. HLA System, Tissue Typing. In: สมชาย เอี่ยมอ่อง. ปลูกถ่ายอวัยวะ (TRANSPLANTATION).กรุงเทพมหานคร:โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์; 2540.p.36-80
7. Terasaki PI, Mandell M, van de Water J, Edgington TS. Human blood lymphocyte cytotoxicity reactions with allogenic antisera. Annals of the New York Academy of Sciences. 1964;120(1):322-34.
8. Kissmeyer-Nielsen, F. Olsen, Steen Petersen, Fjeldborg VP. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. The Lancet. 1966;288(7465):662-5.
9. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. The New England Journal of Medicine. 1969;280(14):735-9.
10. Johnson Ah, Rossen Rd, Butler WT. Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: Identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. Tissue Antigens. 1972;2(4):215-26.
11. Amy H, Geoffrey L, Rosemarie S. ASHI Technical manual [electronic resource]: Mount Laurel : American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, c2000.4<sup>th</sup>ed; 2000.
12. Lee PP, Garovoy MR. Flow cytometry crossmatching: The first 10 years. transplantation reviews. 1994;8(1):1-14.
13. Talbot D, Cavanagh G, Coates E, Givan Al, Shenton Bk, Lennard Twj, et al. Improved graft outcome and reduced complication due to flow cytometric

crossmatching and DR matching in renal transplantation. *Transplantation*.

1992;53(4):925-8.

14. Kockathong K, Vejbaesya S, Bejrachandra S, Pattanapanyasat K. Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2005;88(6):769-74.

15. Kupatawintu P, Tatawatorn A, Premasathian N, Avihingsanon Y, Leelahavanichkul A, Hirankarn N. Association between flow cytometric crossmatching and graft survival in Thai cadaveric-donor kidney transplantation. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. 2016;34(1):86-93.

16. ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ. บริจาคอวัยวะ : ไต [cited 2019 3105]. Available from: [http://www.organdonate.in.th/About\\_Donation/kidney.html](http://www.organdonate.in.th/About_Donation/kidney.html).

17. นพ.เจษฎา แสงสุพรรณ. ประวัติศาสตร์ และวิวัฒนาการของการปลูกถ่ายอวัยวะ. In: สมชาย เอี่ยมอ่อง. *ปลูกถ่ายอวัยวะ (TRANSPLANTATION)*. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์; 2540.p.1-12

18. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, et al. Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17088.

19. ไทย.กฎหมาย. ข้อบังคับแพทยสภา ว่าด้วยการรักษาจริยธรรมแห่งวิชาชีพเวชกรรม (ฉบับที่ ๕) พ.ศ. ๒๕๖๐. กรุงเทพฯ: แพทยสภา; 2560.

20. Healey J. *Organ and Tissue Donation*. Thirroul, N.S.W.: Spinney Press; 2011.

21. เกียรติ รัชรัฐธรรม. ภูมิคุ้มกันวิทยาของการปลูกถ่ายอวัยวะ. In: สมชาย เอี่ยมอ่อง. *ปลูกถ่ายอวัยวะ (TRANSPLANTATION)*. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์; 2540.p.13-35

22. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 2010;63(5):387-90.

23. Brent L. *A history of transplantation immunology*. San Diego: Academic Press; 1997.

24. Anderson RH. *Paediatric cardiology*. [electronic resource]: Philadelphia, PA : Churchill Livingstone/Elsevier, c2010.3<sup>rd</sup> ed.; 2010.

25. Karen Sullivan SHL. Concepts and background of histocompatibility testing. In: Gilman N. Tardif JMM, editor. *Tissue Typing Reference manual* 1993. 3<sup>rd</sup> ed.; 1993. p. 1-28.

26. Barber LD, Parham P, Marsh SGE. *The HLA FactsBook*. San Diego, Calif: Academic Press; 2000.

27. Zachary AA, Leffell MS. HLA mismatching strategies for solid organ transplantation - A balancing act. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:575-80

28. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Luminex((R)) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2013;40(3):182-9.
29. Patrizia Amico GH, Michael M, Stefan Sc. Detection of HLA antibodies prior to renal transplantation: prospects and limitations of new assays. *Swiss Medical Weekly*. 2008;138:472-6.
30. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(12):1488-500.
31. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(2):125-33.
32. Piazza A, Ozzella G, Poggi E, Caputo D, Manfreda A, Adorno D. Virtual crossmatch in kidney transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(7):2195-8.
33. Jani V, Ingulli E, Mekeel K, Morris GP. Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients. *Human Immunology*. 2017;78(2):72-9.
34. Johnson CP, Schiller JJ, Zhu YR, Hariharan S, Roza AM, Cronin DC, et al. Renal transplantation with final allocation based on the virtual crossmatch. *American Journal of Transplantation*. 2016;16(5):1503-15.
35. Ho EK, Vasilescu ER, Colovai AI, Stokes MB, Hallar M, Markowitz GS, et al. Sensitivity, specificity and clinical relevance of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplantation. *Transplant Immunology*. 2008;20(1):61-7.
36. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE, Lou CD, Garovoy MR, Bacchetti P, et al. Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants. *Clinical Transplantation*. 2000;14(2):167-73.
37. Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, Schnitzler MA, Tuttle-Newhall J, Xiao H, et al. The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(9):3471-4.
38. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;1(3):404.
39. Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC, McCullough C, Pruett TL. The use of pronase-digested human leukocytes to improve specificity of the flow cytometric crossmatch. *Transplant International*. 1995;8(6):472-80.
40. Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA, Jackson AM. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Human Immunology*. 2011;72(4):330-6.

41. Park H, Lim YM, Han BY, Hyun J, Song EY, Park MH. Frequent false-positive reactions in Pronase-treated T-cell flow cytometric cross-match tests. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(1):87-90.
42. Hirai T, Kohei N, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Significance of low-level DSA detected by solid-phase assay in association with acute and chronic antibody-mediated rejection. *Transplant International*. 2012;25(9):925-34.
43. Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, Murphey C, Bray RA, Neumann J, et al. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Human Immunology*. 2018;79(1):28-38.
44. Al Attas RA, Alzahrani S, Lopez R, Liacini A, Al Qahtani Z, Al Otaibi A, et al. It's about everything: validation and optimization of 96-well tray flow cytometry crossmatch. *Transplantation Proceedings*. 2019;51(2):492-6.
45. Mohanka R EKM, Jin J, Sharma A, Halawa A. Careful Interpretation of HLA Typing and Cross-Match Tests in Kidney Transplant. *Journal of Nephrology : Journal of Urology*. 2017;3(5).
46. ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ. เกณฑ์การจัดสรรไต จากผู้บริจาคอวัยวะสมองตาย [cited 2019 19 07]. Available from: [http://www.organdonate.in.th/About\\_Donation/kidney\\_manage.html](http://www.organdonate.in.th/About_Donation/kidney_manage.html).
47. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney International*. 2015;87(2):272-5.
48. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney International*. 2004;65(2):713-8.
49. Stephen B. Hulley SRC, Warren S. Browner, Deborah G. Grady, Thomas B. Newman. *Designing Clinical Research*. 4 ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2013.
50. Choudhury AR. A comprehensive review of cell isolation methods [last modified : 2019-04-19; original version : 2017-04-09]. Available from: <https://www.labome.com/method/Cell-Isolation.html>.
51. Lazda VA, Pollak R, Mozes MF, Jonasson O. The relationship between flow cytometer crossmatch results and subsequent rejection episodes in cadaver renal allograft recipients. *Transplantation*. 1988;45(3).
52. LeFor WM, Ackermann JR, Alveranga DY, Bowers VD, Heinrichs DF, Kahana L, et al. Flow cytometry crossmatching and primary cadaver kidney graft outcome: relevance of T and B cell targets, historic sera and autologous controls. *Clinical Transplantation*. 1996;10(6 Pt 2):601-6.

53. Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, Barnes T, Brooks K, Hymel P, et al. Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using Pronase: Potential Implications in Renal Transplantation. *Transplantation*. 2001;71(3):422-8.
54. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, Bachelet T, Moreau K, Morel D, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation*. 2011;91(5):527-35.
55. Van der Vliet JA, Warlé MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013;18(2).
56. Lauronen J, Peräsaari JP, Saarinen T, Jaatinen T, Lempinen M, Helanterä I. Shorter cold ischemia time in deceased donor kidney transplantation reduces the incidence of delayed graft function especially among highly sensitized patients and kidneys from older donors. *Transplantation Proceedings*. 2020;52(1):42-9.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 24 ตารางแสดงค่า MCFS และผลการทดสอบ FCXM ของตัวอย่างทั้งหมด 199 ตัวอย่าง เทียบกับผล CDC และ AHG-CDC

No.	Result No.	CDC, AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
1	SER001	Neg	Neg	0.00	Neg	59.11	Neg
2	SER002	Neg	Neg	-1.03	Neg	-21.92	Neg
3	SER003	Neg	IgM	0.00	Neg	-28.91	Neg
4	SER004	Neg	Neg	-1.03	Neg	-38.00	Neg
5	SER005	Neg	Neg	0.00	Neg	31.98	Neg
6	SER006	Neg	Neg	0.00	Neg	-13.46	Neg
7	SER007	Neg	Neg	1.02	Neg	34.87	Neg
8	SER008	Neg	Neg	0.00	Neg	147.08	Neg
9	SER009	Neg	Neg	0.00	Neg	34.87	Neg
10	SER010	Neg	Neg	0.00	Neg	12.88	Neg
11	SER011	Neg	Neg	-3.10	Neg	-75.86	Neg
12	SER012	Neg	Neg	3.10	Neg	8.03	Neg
13	SER013	Neg	Neg	1.04	Neg	38.10	Neg
14	SER014	Neg	Neg	3.10	Neg	20.10	Neg
15	SER015	Neg	Neg	0.00	Neg	-23.90	Neg
16	SER016	Neg	Neg	<b>5.12</b>	<b>Pos</b>	-34.03	Neg
17	SER017	Neg	Neg	-1.05	Neg	-5.88	Neg
18	SER018	Neg	IgM	-3.91	Neg	86.85	Neg
19	SER019	Neg	Neg	-3.07	Neg	-99.97	Neg
20	SER020	Neg	Neg	2.00	Neg	-154.83	Neg
21	SER021	Neg	Neg	-3.07	Neg	-135.03	Neg
22	SER022	Neg	Neg	-3.07	Neg	-31.29	Neg
23	SER023	Neg	Neg	-2.04	Neg	-40.96	Neg

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
24	SER024	Neg	IgM	-3.10	Neg	-98.95	Neg
25	SER025	Neg	Neg	0.00	Neg	95.94	Neg
26	SER026	Neg	Neg	-1.03	Neg	-17.02	Neg
27	SER027	Neg	Neg	-2.08	Neg	4.01	Neg
28	SER028	Neg	Neg	0.00	Neg	-35.95	Neg
29	SER031	Neg	Neg	0.00	Neg	-5.22	Neg
30	SER032	Neg	Neg	0.00	Neg	-4.16	Neg
31	SER033	Neg	Neg	-2.08	Neg	-5.22	Neg
32	SER034	Neg	Neg	1.02	Neg	1.02	Neg
33	SER035	Neg	Neg	0.00	Neg	-14.12	Neg
34	SER036	Neg	Neg	-3.10	Neg	0.00	Neg
35	SER038	Neg	Neg	0.00	Neg	0.00	Neg
36	SER039	Neg	Neg	-1.02	Neg	23.98	Neg
37	SER040	Neg	Neg	-1.02	Neg	0.00	Neg
38	SER041	Neg	Neg	-1.02	Neg	-5.99	Neg
39	SER042	Neg	Neg	-1.02	Neg	-5.99	Neg
40	SER043	Neg	Neg	-2.06	Neg	-4.20	Neg
41	SER044	Neg	Neg	0.00	Neg	-7.08	Neg
42	SER045	Neg	Neg	-1.02	Neg	-7.08	Neg
43	SER046	Neg	Neg	0.00	Neg	-49.00	Neg
44	SER047	Neg	Neg	0.00	Neg	0.00	Neg
45	SER048	Neg	Neg	0.00	Neg	13.44	Neg
46	SER050	Neg	Neg	0.00	Neg	66.65	Neg
47	SER051	Neg	Neg	1.03	Neg	68.68	Neg
48	SER052	Neg	Neg	-3.10	Neg	-43.00	Neg
49	SER053	Neg	Neg	-1.78	Neg	-4.03	Neg
50	SER054	Neg	Neg	-1.78	Neg	10.02	Neg
51	SER055	Neg	Neg	<b>5.17</b>	<b>Pos</b>	-26.16	Neg

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
52	SER056	IgM	IgM	2.10	Neg	93.90	Neg
53	SER057	Neg	Neg	3.13	Neg	2.99	Neg
54	SER058	Neg	Neg	<b>6.18</b>	<b>Pos</b>	-18.19	Neg
55	SER059	Neg	Neg	3.13	Neg	159.92	Neg
56	SER060	Neg	Neg	-3.95	Neg	16.03	Neg
57	SER061	Neg	Neg	-3.10	Neg	-25.90	Neg
58	SER062	Neg	Neg	-1.01	Neg	0.00	Neg
59	SER064	Neg	Neg	0.00	Neg	9.13	Neg
60	SER065	Neg	Neg	-5.12	Neg	-12.96	Neg
61	SER066	Neg	Neg	-4.08	Neg	-1.92	Neg
62	SER067	Neg	Neg	-3.05	Neg	-5.86	Neg
63	SER068	Neg	Neg	-4.08	Neg	152.35	Neg
64	SER069	Neg	Neg	-1.01	Neg	27.12	Neg
65	SER070	Neg	Neg	-3.05	Neg	-16.06	Neg
66	SER071	Neg	Neg	2.96	Neg	2.15	Neg
67	SER072	Neg	Neg	-3.05	Neg	78.01	Neg
68	SER073	Neg	Neg	-3.10	Neg	-9.85	Neg
69	SER074	Neg	Neg	<b>5.17</b>	<b>Pos</b>	63.02	Neg
70	SER075	Neg	Neg	4.16	Neg	-4.81	Neg
71	SER076	Neg	Neg	3.13	Neg	8.17	Neg
72	SER077	Neg	Neg	<b>7.18</b>	<b>Pos</b>	13.03	Neg
73	SER078	Neg	Neg	4.16	Neg	128.05	Neg
74	SER079	Neg	Neg	2.10	Neg	4.01	Neg
75	SER080	Neg	Neg	<b>5.17</b>	<b>Pos</b>	0.94	Neg
76	SER081	Neg	Neg	1.05	Neg	82.13	Neg
77	SER082	Neg	IgG	2.02	Neg	560.75	Pos
78	SER083	Neg	IgM	-2.06	Neg	<b>249.01</b>	<b>Pos</b>
79	SER084	Neg	Neg	0.00	Neg	133.86	Neg



No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
80	SER085	Neg	Neg	0.00	Neg	20.93	Neg
81	SER086	Neg	Neg	-1.02	Neg	21.94	Neg
82	SER087	Neg	Neg	2.02	Neg	-54.12	Neg
83	SER088	Neg	IgG	-1.02	Neg	368.77	Pos
84	SER089	Neg	Neg	0.00	Neg	92.77	Neg
85	SER090	Neg	Neg	-2.06	Neg	-67.97	Neg
86	SER091	Neg	Neg	3.07	Neg	-0.98	Neg
87	SER092	Neg	Neg	1.03	Neg	0.00	Neg
88	SER093	Neg	Neg	1.03	Neg	0.00	Neg
89	SER094	Neg	Neg	1.03	Neg	6.01	Neg
90	SER095	Neg	Neg	1.03	Neg	9.05	Neg
91	SER096	Neg	Neg	1.03	Neg	1.93	Neg
92	SER097	Neg	Neg	2.06	Neg	6.01	Neg
93	SER098	Neg	IgM	1.03	Neg	1.93	Neg
94	SER099	Neg	Neg	0.00	Neg	0.97	Neg
95	SER100	Neg	Neg	2.06	Neg	36.99	Neg
96	SER101	IgM	IgM	0.00	Neg	111.97	Neg
97	SER102	Neg	Neg	-1.03	Neg	1.02	Neg
98	SER103	Neg	Neg	-1.03	Neg	29.91	Neg
99	SER104	Neg	Neg	1.02	Neg	-1.03	Neg
100	SER105	Neg	Neg	0.00	Neg	115.91	Neg
101	SER106	Neg	Neg	0.00	Neg	0.00	Neg
102	SER107	Neg	Neg	0.00	Neg	4.04	Neg
103	SER108	Neg	Neg	0.00	Neg	-5.99	Neg
104	SER109	Neg	Neg	1.02	Neg	-7.08	Neg
105	SER110	Neg	Neg	-1.03	Neg	-7.08	Neg
106	SER111	Neg	Neg	-1.03	Neg	3.82	Neg
107	SER112	Neg	Neg	0.00	Neg	10.74	Neg

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
108	SER113	Neg	Neg	0.00	Neg	2.69	Neg
109	SER114	Neg	Neg	-1.03	Neg	0.00	Neg
110	SER115	Neg	Neg	-1.03	Neg	0.00	Neg
111	SER116	Neg	Neg	-1.03	Neg	8.02	Neg
112	SER117	Neg	Neg	0.00	Neg	-19.11	Neg
113	SER118	Neg	Neg	0.00	Neg	3.04	Neg
114	SER119	Neg	Neg	1.02	Neg	-7.98	Neg
115	SER120	Neg	Neg	-1.03	Neg	-5.04	Neg
116	SER121	Neg	Neg	0.00	Neg	-9.98	Neg
117	SER122	Neg	Neg	-1.03	Neg	-4.08	Neg
118	SER123	Neg	Neg	-1.03	Neg	-1.24	Neg
119	SER124	Neg	Neg	-1.03	Neg	-19.11	Neg
120	SER125	Neg	Neg	0.00	Neg	-13.06	Neg
121	SER126	Neg	Neg	0.00	Neg	54.94	Neg
122	SER127	Neg	Neg	0.00	Neg	156.81	Neg
123	SER128	Neg	Neg	1.02	Neg	21.00	Neg
124	SER129	Neg	Neg	0.00	Neg	8.82	Neg
125	SER130	Neg	Neg	0.00	Neg	17.86	Neg
126	SER131	Neg	Neg	-2.08	Neg	12.83	Neg
127	SER132	Neg	Neg	-1.03	Neg	12.83	Neg
128	SER133	Neg	Neg	-1.03	Neg	9.76	Neg
129	SER134	Neg	Neg	0.00	Neg	-2.02	Neg
130	SER135	Neg	Neg	1.03	Neg	1.98	Neg
131	SER136	Neg	Neg	0.00	Neg	3.93	Neg
132	SER137	Neg	Neg	1.03	Neg	-2.02	Neg
133	SER138	Neg	Neg	-1.04	Neg	-4.10	Neg
134	SER139	Neg	Neg	1.03	Neg	3.93	Neg
135	SER140	Neg	Neg	1.03	Neg	1.98	Neg

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
136	SER141	Neg	Neg	2.06	Neg	9.94	Neg
137	SER142	Neg	Neg	1.04	Neg	3.02	Neg
138	SER143	Neg	Neg	3.10	Neg	2.02	Neg
139	SER144	Neg	Neg	2.08	Neg	4.01	Neg
141	SER146	Neg	Neg	1.04	Neg	-3.10	Neg
142	SER147	Neg	Neg	-2.06	Neg	-6.12	Neg
143	SER148	Neg	Neg	-2.06	Neg	2.94	Neg
144	SER149	Neg	Neg	-1.02	Neg	-8.95	Neg
145	SER150	Neg	Neg	-2.06	Neg	1.97	Neg
146	SER151	IgM	IgG	0.00	Neg	318.97	Pos
147	SER152	Neg	Neg	-1.02	Neg	-5.08	Neg
148	SER153	IgM	IgG	-1.02	Neg	337.92	Pos
149	SER154	Neg	Neg	0.00	Neg	1.86	Neg
150	SER155	Neg	Neg	-1.03	Neg	13.10	Neg
151	SER156	Neg	Neg	-1.03	Neg	2.96	Neg
152	SER157	Neg	Neg	1.02	Neg	1.86	Neg
153	SER158	Neg	Neg	0.00	Neg	9.01	Neg
154	SER159	Neg	Neg	-1.03	Neg	4.06	Neg
155	SER160	Neg	Neg	1.02	Neg	-1.13	Neg
156	SER161	Neg	Neg	2.06	Neg	38.30	Neg
157	SER162	Neg	Neg	1.03	Neg	-1.04	Neg
158	SER163	Neg	Neg	0.00	Neg	-3.16	Neg
159	SER165	Neg	Neg	1.03	Neg	16.39	Neg
160	SER166	Neg	Neg	2.06	Neg	-51.88	Neg
161	SER167	Neg	Neg	2.06	Neg	1.03	Neg
162	SER168	Neg	Neg	2.06	Neg	79.12	Neg
163	SER169	Neg	IgG	2.06	Neg	313.95	Pos
164	SER170	Neg	Neg	0.00	Neg	150.89	Neg

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
165	SER171	Neg	Neg	0.00	Neg	78.56	Neg
166	SER172	Neg	Neg	-1.04	Neg	105.57	Neg
167	SER173	Neg	Neg	1.03	Neg	184.07	Neg
168	SER174	Neg	IgG	0.00	Neg	248.82	Pos
169	SER175	Neg	Neg	1.03	Neg	7.18	Neg
170	SER176	Neg	Neg	0.00	Neg	3.13	Neg
171	SER177	Neg	Neg	2.06	Neg	6.18	Neg
172	SER178	Neg	Neg	2.06	Neg	3.13	Neg
173	SER179	Neg	Neg	1.03	Neg	3.13	Neg
174	SER180	Neg	IgG	4.12	Neg	509.98	Pos
175	SER181	Neg	Neg	2.08	Neg	53.86	Neg
176	SER182	Neg	Neg	1.04	Neg	-35.99	Neg
177	SER183	Neg	Neg	4.12	Neg	5.86	Neg
178	SER184	Neg	Neg	1.04	Neg	-35.99	Neg
179	SER185	Neg	IgG	1.04	Neg	488.79	Pos
180	SER186	Neg	Neg	3.10	Neg	-13.99	Neg
181	SER187	IgM	IgG	3.10	Neg	576.95	Pos
182	SER188	Neg	Neg	3.10	Neg	46.92	Neg
183	SER189	Neg	Neg	-3.05	Neg	-5.02	Neg
184	SER191	Neg	Neg	-4.08	Neg	-44.00	Neg
185	SER192	Neg	Neg	-2.02	Neg	24.89	Neg
186	SER193	Neg	IgG	1.00	Neg	526.87	Pos
187	SER194	Neg	Neg	-5.12	Neg	1.95	Neg
188	SER195	Neg	Neg	-3.05	Neg	-59.98	Neg
189	SER196	Neg	Neg	-2.02	Neg	-28.00	Neg
190	SER197	IgM	IgG	<b>5.85</b>	<b>Pos</b>	526.87	Pos
191	SER198	Neg	Neg	0.00	Neg	1.05	Neg
192	SER199	Neg	IgG	-2.06	Neg	<b>51.15</b>	<b>Neg</b>

No.	Result No.	CDC + AHG-CDC		FCXM T cell		FCXM B cell	
		T cell	B Cell	MCS	Result	MCS	Result
193	SER200	Neg	Neg	-2.06	Neg	30.12	Neg
194	SER201	Neg	Neg	0.00	Neg	4.16	Neg
195	SER202	Neg	Neg	-2.06	Neg	26.00	Neg
196	SER203	Neg	Neg	3.02	Neg	5.17	Neg
197	SER204	Neg	Neg	-3.10	Neg	-1.06	Neg
198	SER205	Neg	IgM	0.00	Neg	129.54	Neg
199	SER206	Neg	Neg	2.02	Neg	12.98	Neg



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นุจันท์ โชคทวีศักดิ์  
วัน เดือน ปี เกิด 20 เมษายน 2533  
สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร  
วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ที่อยู่ปัจจุบัน 3/94 ซ.วุฒากาศ 53 ถ.วุฒากาศ แขวงบางค้อ เขตจอมทอง กรุงเทพฯ 10150