นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเม็ดเลือดแดงซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นน้ำยาตรวจกรองและตรวจแยกชนิดแอนติบอดี

อุดม ติ่งต้อย ภูรยา โอวาทกา ปาจรีย์ ดีสิน และ จินตนา ทับรอด
ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ *เพื่อศึกษาความคงทน (stability) และความจำเพาะ (specificity) ของแอนติเจนหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ papain วิธีการคือใช้ papain ย่อย screening cells และ panel cells ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ทดสอบความคงทนของแอนติเจน D, E, Jk^a, P_1, Le^a และ Le^b โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเจือจาง (two-fold dilution) ที่จำเพาะกับหมู่เลือดเพื่อหาความแรงของแอนติเจน ด้วยเทคนิคเจล (microcolumn agglutination technique) ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ คิดความแรงเป็นคะแนน (score) เปรียบเทียบความแรงของแอนติเจนโดยใช้สถิติ Chi-square test และทดสอบความจำเพาะ ด้วยวิธีหลอดทดลอง (tube method) กับซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก 140 ราย รวมทั้งทดสอบกับซีรัมของผู้บริจาคโลหิตในงานประจำวันจำนวน 680 รายเปรียบเทียบกับ screening cells ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ใหม่ประจำวัน ผลการศึกษาพบว่า ความคงทนของแอนติเจนแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) การทดสอบความจำเพาะในการตรวจกรองแอนติบอดีพบว่าให้ผลบวกจำนวน 82 ราย ใน 140 รายเมื่อนำไปตรวจแยกชนิดแอนติบอดีตรวจพบชนิดแอนติบอดีตรงกับประวัติเดิมซึ่งเป็นแอนติบอดีในระบบ Rh, Kidd, Diego, P และ Lewis ส่วนการตรวจกรองแอนติบอดีที่ให้ผลลบจำนวน 58 รายนั้น พบว่าเป็นแอนติบอดีในระบบ MNS และ Duffy แอนติเจนทั้งสองระบบนี้ถูกทำลายด้วย papain ได้ ทำให้ตรวจไม่พบแอนติบอดีในระบบดังกล่าว ส่วนการทดสอบกับซีรัมของผู้บริจาคโลหิตในงานประจำวันพบว่าการตรวจกรองให้ผลการทดสอบสอดคล้องกันโดยให้ผลลบจำนวน 567 ราย คิดเป็นร้อยละ 83.4 ให้ผลบวก 113 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.6*

จากการศึกษานี้พบว่าน้ำยาเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีซึ่งได้ย่อยด้วยเอนไซม์ papain มีความคงทนของแอนติเจนตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์และมีความจำเพาะ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จพร้อมใช้ได้

Key Words : ● *Enzyme* ● *Stability* ● *Specificity*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2556;23:129-35.

บทนำ

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีเป็นตัวช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบ ในงานธนาคารเลือดสามารถนำมาช่วยเสริมปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีได้ โดยเฉพาะปฏิกิริยาของหมู่เลือดบางระบบ เช่น ระบบ Rh, Kidd, Lewis, P และ Ii เป็นต้น จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจกรองและตรวจหาชนิดแอนติบอดี (antibody screening and identification) โดยเอนไซม์จะไปย่อย sialic acid ที่อยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง ทำให้ประจุลบบนเม็ดเลือดแดงลดลงมีผลทำให้ระยะห่างระหว่างเม็ดเลือดแดง (zeta potential) ลดลง เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติบอดีชนิดไม่สมบูรณ์ (incomplete antibody) จับอยู่ที่ผิว จึงเข้ามาใกล้กันและเกิดการจับกลุ่ม (agglutination) และหรือปฏิกิริยาเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) ได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันเอนไซม์ทำลายแอนติเจนของหมู่เลือดบางระบบได้ เช่น ระบบ MNS และ Duffy ซึ่งมี sialic acid เป็นโครงสร้างของหมู่เลือด[1] การนำเอนไซม์มาใช้ในงานธนาคารเลือดเริ่มในปี ค.ศ. 1947 รายงานของ Morton และ Pickles พบว่าเม็ดเลือดแดงที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin สกัดจากกระเพาะหมูทำปฏิกิริยากับ incomplete antibody[2] ต่อมามีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้รายงานการใช้เอนไซม์ในการย่อยเม็ดเลือดแดง ได้แก่ ในปี ค.ศ. 1955 Low นำเอนไซม์ papain สกัดจากมะละกอมาใช้[3] ในปี ค.ศ. 1957 Haber และ Rosenfield รายงานการใช้เอนไซม์ ficin สกัดจากผลมะเดื่อ[4] และในปี ค.ศ.

ได้รับต้นฉบับ 2 มกราคม 2556 รับลงตีพิมพ์ 30 พฤษภาคม 2556
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ อุดม ติ่งต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 e-mail : domting2001@yahoo.com

1959 Pirofsky และ Mangum รายงานการใช้เอนไซม์ bromelin สกัดจากสับปะรด[5] เป็นต้น

การนำเอนไซม์มาใช้มี 2 วิธีคือ วิธีแรก one-stage enzyme technique ทำโดยการเติมเอนไซม์ลงไปในส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงกับซีรัม วิธีนี้ง่ายและสะดวก แต่ความไวในการทดสอบต่ำเนื่องจากเอนไซม์ทำลายแอนติบอดีซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในซีรัมได้ด้วย อีกวิธีคือ two -stage enzyme technique ต้องนำเม็ดเลือดแดงไปย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อจากนั้นล้างเม็ดเลือดแดงเอาเอนไซม์ออกแล้วจึงนำเม็ดเลือดแดงไปทดสอบกับซีรัม วิธีนี้เป็นการทดสอบที่มีความไวกว่าวิธีแรกแต่ใช้เวลาในการย่อยเม็ดเลือดแดงนานกว่า[6]

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยมีวัตถุประสงค์ที่จะนำผลิตภัณฑ์เซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีย่อยด้วยเอนไซม์ papain มาใช้ในงานประจำวันจึงได้ศึกษา ความคงทน (stability) ความจำเพาะ (specificity) ของแอนติเจนหมู่เลือดเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จพร้อมใช้

วัสดุและน้ำยา

1. Screening cells ชนิด O1, O2, pool O cells และ panel cells (Lot 54060, 54080, 54091 และ 54100 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ)

2. Antisera ของผู้บริจาคโลหิต จากฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิตศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้แก่ anti-D, anti-E, anti-Jk^a,anti-P_1, anti-Le^a และ anti-Le^b บรรจุหลอดๆ ละ 2 mL จำนวน 7 ชุด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับทดสอบความคงทนของแอนติเจน

3. ซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกและแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย แต่พบได้บ่อยจำนวน 140 ราย จากฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต จำนวน 125 ราย และของผู้ป่วยจากธนาคารเลือดโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 15 ราย สำหรับทดสอบความจำเพาะของแอนติเจน โดยแอนติบอดีเหล่านี้มีความแรงตั้งแต่ 1+ ถึง 3+ ได้จำแนกแอนติบอดีออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 แอนติบอดีที่ enzyme enhance reaction ได้แก่ anti-D 15 ราย anti-E 15 ราย anti-E+c 1 ราย anti-Jk^a 1 ราย anti-Jk^b 1ราย anti-Di^a 1 ราย anti-P_1 11 ราย anti-Le^a 8 ราย anti-Le^b 7 ราย anti-Le^a + Le^b 13 ราย

กลุ่มที่ 2 แอนติบอดีที่ตรวจพบได้ด้วย enzyme technique เพียงวิธีเดียว ได้แก่ anti-D+E 2 ราย anti-E 2 ราย anti-E+c 1 ราย anti E+Mi^a 1 ราย

กลุ่มที่ 3 แอนติบอดีที่เกิดร่วมกันหลายชนิด (mixed antibodies) ได้แก่ anti-E+Mi^a 2 ราย anti-E+Mi^a 1 ราย anti-E+c+Mi^a+Jk^a 1 ราย

กลุ่มที่ 4 แอนติบอดีที่ enzyme inhibit reaction ได้แก่ anti-M 3 ราย anti-Mi^a 52 ราย anti-S 2 ราย anti-Fy^a 1 ราย

4. ซีรัมจาก clotted blood ของผู้บริจาคโลหิตที่เหลือจากการตรวจคัดกรองในงานประจำวันจาก ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิตจำนวน 680 ราย ในการตรวจกรองแอนติบอดีใช้ screening cells ชนิด pool O cells

5. ID-card NaCl/Enzyme บริษัท DiaMed AG, Switzerland

วิธีการ

1. การเตรียม papainized red blood cells
   - 1.1 เตรียม working papain โดยผสม 1 ส่วนของ 1% stock papain กับ 9 ส่วนของ Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.3
   - 1.2 นำ screening cells และ panel cells ใหม่อายุ 1 วัน ล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือปกติ เตรียม เป็น packed red cells (PRC)
   - 1.3 ผสม 4 ส่วนของ working papain กับ 1 ส่วนของ PRC แต่ละชนิด อุ่นที่อุณภูมิห้องนาน 8-10 นาที
   - 1.4 ล้างด้วยน้ำเกลือปกติ 3 ครั้ง และน้ำยารักษาสภาพเม็ดเลือดแดง (Alsever's solution) 1 ครั้ง เตรียมเป็น 3% เซลล์ใน Alsever's solution บรรจุขวดปราศจากเชื้อ
   - 1.5 ควบคุมคุณภาพโดยทดสอบกับ anti-D (IgG) และ inert serum ได้ผลบวกและผลลบถูกต้องตามลำดับ[6]

2. การทดสอบความคงทน (stability) ของแอนติเจน D, E, Jk^a, P_1, Le^a และ Le^b บนผิวเม็ดเลือดแดงซึ่งย่อยด้วย papain และเก็บ 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยใช้เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนอ่อน (weak antigen) ได้แก่ DCe/dce, DCe/DcE, Jk(a+b+), P_1, Le(a+b-) และ Le(a-b+) ทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนนั้น โดยเจือจางแอนติบอดีแบบ two – fold dilution เพื่อดูความแรงของแอนติเจน ทดสอบครั้งแรกในวันที่เตรียม papainized cells (0 week) และทดสอบครั้งต่อไปทุกสัปดาห์ต่อเนื่องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ด้วยเทคนิคเจล
   - 2.1 นำแอนติบอดีมาละลายครั้งละ 1 ชุด เจือจางซีรัมด้วย 1% bovine serum albumin โดยเริ่มจาก 1:1 จนถึง 1:64
   - 2.2 เติม 50 ไมโครลิตรของ 1% เซลล์แต่ละชนิดลงใน

ID-card NaCl/Enzyme และเติม 25 ไมโครลิตรของแอนติบอดีแต่ละ dilution โดยเริ่มที่ dilution สุดท้าย (1:64) ไปหา dilution ที่ 1:1 ลงในเซลล์ที่มีแอนติเจนตรงกับชนิดแอนติบอดี

2.3 อุ่นที่อุณภูมิ 37°C นาน 15 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดง[7] เป็นคะแนน (score)[8] ดังนี้ 4+ = 12 คะแนน 3+ = 10 คะแนน 2+ = 8 คะแนน 1+ = 5คะแนน และ weak = 2 คะแนน

2.4 ความคงตัวของแอนติเจนดูจากคะแนนความแรงของแอนติเจน 0-6 สัปดาห์โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 15.0 คำนวณค่า Chi-square test กำหนดค่านัยสำคัญ $p < 0.05$

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ screening cells ชนิด O1, O2 และ pool O cells และ panel cells โดยนำมาย่อยด้วย papain ดังข้อ 1 เก็บ 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C นำมาทดสอบกับซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีและซีรัมของผู้บริจาคโลหิตในงานประจำวัน ด้วยวิธีหลอดทดลองตั้งแต่สัปดาห์แรกจนครบ 6 สัปดาห์

3.1 ทดสอบ screening O1, O2 กับซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีจำนวน 140 ราย ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ enzyme enhance reaction และ enzyme inhibit reaction โดยใช้ซีรัม 2 หยด เติม 3% screening cells 1 หยด ผสมให้เข้ากันอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ปั่นอ่านผลปฏิกิริยาการแตกหรือการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายใดที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองจะนำไปตรวจแยกชนิดแอนติบอดีด้วยชุด panel cells โดยวิธีเดียวกัน สำหรับ positive และ negative control ใช้ซีรัมที่มี anti-D (IgG) และ inert serum ตามลำดับ

3.2 ทดสอบ screening cells ชนิด pool O cells กับซีรัมของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 680 ราย เปรียบเทียบกับ pool O cells ซึ่งย่อยด้วย papain ในแต่ละวันที่ทำการทดสอบ ใช้วิธีทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความคงทนของแอนติเจนหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ย่อยด้วย papain และเก็บนาน 6 สัปดาห์ ตรวจหาความแรงของแอนติเจน โดยทดสอบกับแอนติบอดีที่ตรงกับแอนติเจนนั้น ในครั้งแรก (0 week) พบว่าแอนติเจน D, E, Jk^a, P_1, Le^a และ Le^b มีความแรงเท่ากับ 37, 46, 34, 22, 26 และ 38 คะแนนตามลำดับ เมื่อทดสอบซ้ำทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ต่อเนื่อง (0-6 weeks) พบว่าความแรงของแอนติเจนแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 1

ผลการทดสอบความจำเพาะของ screening cells ชนิด O1, O2 รวมทั้ง panel cells ที่ย่อยด้วย papain ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนครบ 6 สัปดาห์กับซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีจำนวน 140 รายได้ผลดังนี้ แอนติบอดีกลุ่มที่ 1 เป็นแอนติบอดีที่ enzyme enhance reaction ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้งหมด 73 ราย นำไปตรวจแยกชนิดแอนติบอดีได้ผลตรงกับชนิดแอนติบอดีเดิม แอนติบอดีกลุ่มที่ 2 เป็นแอนติบอดีที่ตรวจพบได้ด้วย enzyme technique เพียงวิธีเดียว ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้ง 6 ราย นำไปตรวจแยกชนิดแอนติบอดีได้ผลตรงกับชนิดแอนติบอดีเดิมเช่นกัน แอนติบอดีกลุ่มที่ 3 เป็นแอนติบอดีที่เกิดร่วมกันหลาย

Table 1 Stability of each antigen at 0-6 weeks indicated by agglutination scores when tested against corresponding antibodies

Antigens	Weeks							X^2	p-value
	0	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th		
D	37	35	35	35	35	35	35	4.540	0.987
E	46	44	44	45	44	44	44	4.720	1.026
Jk^a	34	36	34	34	32	31	31	11.196	0.105
P_1	22	22	26	24	24	24	24	8.282	0.264
Le^a	26	26	24	26	26	26	26	4.540	0.987
Le^b	38	41	38	41	38	41	41	9.617	0.090

ชนิด ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้ง 4 ราย ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบว่าจำนวนชนิดแอนติบอดีได้ไม่เท่าเดิม แอนติบอดีกลุ่มที่ 4 เป็นแอนติบอดีที่ enzyme inhibit reaction ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลลบทั้ง 58 รายซึ่งเป็นแอนติบอดีในระบบ MNS และ Duffy ดังแสดงใน Table 2

ส่วนการทดสอบ screening cells ชนิด pool O cells ที่ย่อยด้วย papain ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนครบ 6 สัปดาห์ กับซีรัมผู้บริจาคโลหิตในงานประจำวันจำนวน 680 ราย เปรียบเทียบกับ pool O cells ที่ย่อยด้วย papain ในวันที่ทำการทดสอบ ให้ผลสอดคล้องกัน โดยให้ผลลบจำนวน 567 ราย คิดเป็นร้อยละ 83.4 ให้ผลบวก 113 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.6

Table 2 Results of antibody screening and identification of 140 known antibodies using enzyme treated RBC

Group	Antibody specificity	No. of samples	Antibody screening		Antibody identification
			No. of positive	No. of negative	
1	D	15	15	-	D
	E	15	15	-	E
	E+c	1	1	-	E+c
	Jk^a	1	1	-	Jk^a
	Jk^b	1	1	-	Jk^b
	Di^a	1	1	-	Di^a
	P_1	11	11	-	P1
	Le^a	8	8	-	Le^a
	Le^b	7	7	-	Le^b
	Le^a+Le^b	13	13	-	Le^a+Le^b
	Total	**73**	**73**	-	
2	D+E	2	2	-	D+E
	E	2	2		E
	E+c	1	1	-	E+c
	E+Mi^a	1	1	-	E
	Total	**6**	**6**	-	
3	E+Mi^a	2	2	-	E
	E+Mi^a	1	1	-	E
	E+c+Mi^a+Jk^a	1	1	-	E+c+Jk^a
	Total	**4**	**4**	-	
4	M	3	-	3	NT
	Mi^a	52	-	52	NT
	S	2	-	2	NT
	Fy^a	1	-	1	NT
	Total	**58**	-	**58**	

Group 1 : enzyme enhance reaction

Group 2 : antibodies detected by enzyme technique only

Group 3 : mixed antibodies that enzyme enhance and inhibit reaction

Group 4 : enzyme inhibit reaction

NT = not tested

วิจารณ์

แอนติเจนหมู่เลือดบนผิวเม็ดเลือดแดงมีการเสื่อมสลายได้ในระหว่างการเก็บ เกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ แอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Lewis จะอยู่ในส่วนน้ำหลั่งของร่างกาย เช่น พลาสมา ซึ่งจะถูกดูดซับเข้าสู่ผิวเม็ดเลือดแดง[9] หรือ แอนติเจน P_1 มีความแรงของแอนติเจนแตกต่างกันในแต่ละบุคคลโดยขึ้นกับพันธุกรรมหรือเชื้อชาติ แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้จะเสื่อมสลายได้ง่าย เป็นต้น อีกทั้งสารละลาย (medium) ที่ใช้เก็บเม็ดเลือดแดงมีส่วนทำให้แอนติเจนเสื่อมสลายได้ เช่น แอนติเจนในระบบ Duffy จะถูก elute ออกจากเม็ดเลือดแดงได้ถ้าเก็บในน้ำเกลือ pH 7.0 หรือใน low ionic strength[10] เป็นต้น มีการศึกษาความคงทนของแอนติเจนหมู่เลือดระบบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ panel cells ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หลังวันหมดอายุของน้ำยา 1 วัน[11] พบว่าแอนติเจนของหมู่เลือดบางระบบมีการเสื่อมสลายไป เช่น แอนติเจนระบบ Rh (ยกเว้น E) ระบบ Kidd เป็นต้น โดยมีความแรงลดลงน้อยกว่าร้อยละ 40 ส่วนแอนติเจน E, P_1, Le^a และ Le^b มีความแรงลดลงมากกว่าร้อยละ 40 จากการศึกษาแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ย่อยด้วย papain เก็บไว้ 6 สัปดาห์ใน Table 1 การทดสอบความคงทนของแอนติเจน 6 ชนิด คือ D, E, Jk^a, P_1, Le^a และ Le^b ในครั้งแรก (0 week) และเมื่อทดสอบซ้ำทุกสัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความแรงของแอนติเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงว่าแอนติเจนทั้ง 6 ชนิดมีความคงทนตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์

การทดสอบความจำเพาะของ screening cells และ panel cells ที่ย่อยด้วย papain และเก็บนาน 6 สัปดาห์กับซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกและแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อยและพบได้บ่อยจำนวน 140 ราย จำแนกเป็นแอนติบอดี 4 กลุ่ม คือ แอนติบอดีกลุ่มที่ 1 เป็นแอนติบอดีที่ enzyme enhance reaction ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้ง 73 ราย เมื่อนำไปตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบ anti-D 15 ราย anti-E 15 ราย anti-E+c 1 ราย anti-Jk^a 1 ราย anti-Jk^b 1 ราย anti-Di^a 1 ราย anti-P_1 11 ราย anti-Le^a 8 ราย anti-Le^b 7 ราย และ anti-Le^a+Le^b 13 ราย ซึ่งให้ผลตรงกับชนิดแอนติบอดีเดิม แอนติบอดีกลุ่มที่ 2 เป็นแอนติบอดีตรวจพบได้ด้วย enzyme technique เพียงวิธีเดียว ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้ง 6 ราย การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบ anti-D+E 2 ราย anti-E 3 ราย และ anti-E+c 1 ราย ให้ผลตรงกับแอนติบอดีเดิม 5 ราย และมี 1 รายที่มีแอนติบอดี 2 ชนิดคือ anti-E+Mi^a แต่ตรวจพบ anti-E ชนิดเดียวไม่พบ anti-Mi^a ทั้งนี้เนื่องจาก papain ทำลายแอนติเจน ระบบ MNS และ Duffy ซึ่งแอนติเจน Mi^a อยู่ในระบบ MNS ด้วย แอนติบอดีกลุ่มที่ 3 เป็นแอนติบอดีที่เกิดร่วมกันหลายชนิด ตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้ง 4 ราย ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบจำนวนชนิดแอนติบอดีน้อยกว่าของเดิม โดยพบ anti-E 3 ราย anti-E+c+Jk^a 1 ราย ซึ่งตรงกับชนิดแอนติบอดีเดิม แต่ตรวจไม่พบ anti-Mi^a ที่เกิดร่วมด้วย ทั้งนี้เพราะ papain ทำลายแอนติเจน Mi^a ไปเช่นกัน แอนติบอดีกลุ่มที่ 4 เป็นแอนติบอดีที่ enzyme inhibit reaction พบว่าการตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลลบทั้ง 58 รายซึ่งผลการตรวจเดิมคือ anti-M 3 ราย anti-Mi^a 52 ราย anti-S 2 ราย และ anti-Fy^a 1 ราย ทั้งนี้เพราะ papain ทำลายแอนติเจนหมู่เลือด MNS และ Duffy จึงทำให้ตรวจไม่พบแอนติบอดีเหล่านี้ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจกรองและตรวจแยกชนิดแอนติบอดีเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ papain จะมีความจำเพาะ ในการตรวจพบหรือไม่พบนั้นขึ้นกับชนิดของแอนติบอดี

เมื่อนำ screening cells ชนิด pool O cells ซึ่งย่อยด้วย papain มาทดสอบกับซีรัมของผู้บริจาคโลหิตในงานประจำวันจำนวน 680 ราย โดยตรวจกรองหาแอนติบอดีเปรียบเทียบปฏิกิริยากับ pool O cells ที่ถูกย่อยด้วย papain ซึ่งเตรียมใหม่ทุกวัน พบว่า ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกันคือ ผลลบจำนวน 567 ราย คิดเป็นร้อยละ 83.4 ผลบวก 113 รายคิดเป็นร้อยละ 16.6 เมื่อสุ่มไปตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีจำนวน 50 ราย โดยเลือกรายที่มีซีรัมจำนวนมากพอที่จะศึกษาและมีผลการตรวจกรอง $\geq$ 1+ ที่ saline IAT เท่านั้น ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีพบว่าสามารถบอกชนิดของแอนติบอดีได้ 31 รายคิดเป็นร้อยละ 62.0 โดยพบ anti- P_1 จำนวน 15 ราย anti- Le^a จำนวน 4 ราย anti- Le^b จำนวน 2 ราย anti- Le^a+Le^b จำนวน 9 ราย และ anti- E+Le^b จำนวน 1 ราย ที่เหลือ 19 รายคิดเป็นร้อยละ 38.0 เป็น unidentified antibodies จำนวน 5 ราย และ non-specific antibodies จำนวน 14 ราย การที่พบแอนติบอดีที่ไม่สามารถบอกชนิดได้ และไม่จำเพาะเช่นนี้ อาจเนื่องจากแอนติบอดีมีปริมาณต่ำมาก การปั่นและอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำให้พบผลบวกปลอมได้

วิธีเอนไซม์เพิ่มความไวในการทดสอบและช่วยให้ปฏิกิริยาชัดเจนขึ้น รวมทั้งทำให้ตรวจพบแอนติบอดีที่มีปริมาณต่ำที่วิธีอื่นๆ ไม่สามารถตรวจพบได้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากโดยเฉพาะการตรวจหาแอนติบอดีที่ผู้ป่วยเริ่มสร้างในระยะแรกซึ่งมีปริมาณต่ำ เช่น ในหญิงตั้งครรภ์หรือผู้ป่วยที่ต้องรับโลหิตเพื่อการรักษาเป็นประจำในระยะยาว เช่น กลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย[12] เป็นต้น แต่เนื่องจาก

เอนไซม์ทำลายตำแหน่งของแอนติเจนระบบ MNS และ Duffy ทำให้ตรวจไม่พบแอนติบอดีเหล่านี้ จึงไม่ควรใช้เอนไซม์เพียงวิธีเดียวในการตรวจหาแอนติบอดี ควรใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เพื่อที่จะได้ตรวจพบแอนติบอดีได้ครอบคลุม[13]และช่วยการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีที่เกิดร่วมกันหลายชนิด (mixed antibodies) โดยอาศัยคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาและการทำลายตำแหน่งแอนติเจน

สรุป

จากการศึกษาแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ papain ในระหว่างการเก็บไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C พบว่า ส่วนใหญ่แอนติเจนมีความคงทนความจำเพาะ สามารถนำไปใช้ในการตรวจกรองและตรวจแยกชนิดแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปพร้อมใช้ เพื่ออำนวยความสะดวกแก่ธนาคารเลือดที่จะนำไปใช้ทดสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยที่ต้องรับโลหิต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ แพทย์หญิงสร้อยสอางค์ พิกุลสด ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงพิมล เชี่ยวศิลป์ ผู้จัดการระบบคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ คุณทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช ผู้ช่วยผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนการศึกษานี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต และเจ้าหน้าที่ธนาคารเลือดโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่จัดหาซีรัมผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยที่ทราบชนิดแอนติบอดีสำหรับทำการศึกษา และคุณกัลยา เกิดแก้วงาม ที่ช่วยคำนวณสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. *Issitt PD, Anstee DJ, eds. Applied Blood Group Serology. 4th ed. Durham, North Calolina : Montgomery Scientific Publications, 1998:48-50.*
2. *Morton JA, Pickles MM. Use of trypsin in the detection of incomplete and Rh antibodies. Nature 1947;159:79-81.*
3. *Low B. A practical method using papain and incomplete Rh antibodies in routine Rh Blood grouping. Vox Sang 1955;5:94-8.*
4. *Haber G, Rosenfield RE. Ficin-treated red cells for hemagglutination studies. In: Andresen PH. Papers in dedication of his 60th birthday. Copenhagen: Munksgaard 1957:45-65.*
5. *Pirofsky B, Mangum MEJ. Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc Soc Exp Biol Med 1959;54:640-9.*
6. *Combs MR. Method 3-5 Enzyme Procedures. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical Manual 16 th ed. Bethesda, MD. AABB 2008:904-8.*
7. *DiaMed-ID Microtyping System, Direction for use, DiaMed AG, Switzerland 1991.*
8. *Combs MR. Method 1-8 reading and grading tube agglutination. In: Roback JD. Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical Manual 16 th ed. Bethesda, MD. AABB 2008:87.*
9. *Harmening DM, Taghizadeh M. The Lewis system. In: Harmening DM, ed. Modern blood banking and transfusion practices, 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis 1999:145-57.*
10. *Calhoun L. Other major blood group systems. In: Harmaning DM, ed. Modern blood banking and transfusion practices, 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis 1999:116-99.*
11. *Mekchay S, Kerdkaewngam K. Stability of blood group antigen in panel cells of National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Annual Transfusion Meeting. The National Conference on Transfusion Medicine 2003:101.*
12. *Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine. 10 th ed. Blackwell Science 1997:247-8.*
13. *Outrakoolpoonsuk K, Bejrachandra S, Saipin J, Leehaphaiboonsakun W, Suratanerungsun V, Plubjuice P. Detection of red cell antibodies by enzyme technique. Thai J Hematol Transf Med 1990;103-10.*

The Study of Enzyme Treated-Red Blood Cell Reagents used for Antibody Screening and Identification

Udom Tingtoy, Phuraya Ovataga, Pajaree Deesin and Jintana Tubrod

Antiserum and Standard cell Preparation Section National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Abstract: *This study aimed to test the stability and specificity of the papainized red blood cell reagents for antibody screening and identification prepared by the National Blood Centre, Thai Red Cross Society. The stability of reagent was performed by titration of two-folded dilution of antisera to determine the strength of the D, E, Jk^a, P_1 ,Le^a and Le^b antigens using microcolumn agglutination technique once a week for 6 consecutive weeks. The results were evaluated using Chi-square test. For specificity and stability, they were tested by test tube method. One hundred and forty known antibodies and 680 serum samples from regular blood donors were tested and compared with the freshly prepared papainized red cells. The results were demonstrated in 0-6th consecutive weeks, with antigen strength of each stability representing but the total score was not statistically significance ($p > 0.05$). Regarding the specificity and stability testing in 140 samples, there were 82 positive for antibody screening. The previous history of the positive antibodies were in Rh, Kidd, Diego, P_1 and Lewis system. Whilst the antibodies with previous history in MNS and Duffy systems could not be detected because they were destroyed by papain enzyme. The results of antibody screening of serum samples from regular blood donors were in agreement with those of 567 negative (83.4%) and 113 positive (16.6%) samples. In conclusion, 6 consecutive weeks of investigating the specificity and stability of antigens in papainized red blood cells for antibody screening and identification is feasible for development of red blood cell reagents.*

Key Words : ● *Enzyme* ● *Stability* ● *Specificity*

J Hematol Transfus Med 2013;23:129-35.