นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อหมู่เลือดบนเม็ดเลือดแดง โดยวิธี Solid Phase Microplate Antiglobulin Test

ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช, จินตนา ทับรอด และ สาริกา เมฆฉาย

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัม และผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ: บทนำและวัตถุประสงค์: *ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ได้พัฒนาวิธี solid phase microplate antiglobulin test(SPMAT) เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อหมู่เลือดบนเม็ดเลือดแดง การแปลผล ปฏิกิริยาผลบวกจะดูการจับของ indicator cells แผ่ในหลุมของ microplate ผลลบ indicator cells จะตกลงที่ก้นหลุมเป็นเม็ดกระดุม แตกต่างจากการอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยวิธี tube test และได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธี SPMAT ที่พัฒนาใหม่ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม โดยทดสอบเปรียบเทียบกับวิธี antiglobulin tube test ด้วย* ***วัสดุและวิธีการ:*** *เซลล์ที่ใช้ทดสอบ (screening cells) จะถูก coated ในหลุมของ microplate โดยใช้ cell fixing buffer เติมแอนติบอดีในซีรัมที่จะทดสอบลงไปทำปฏิกิริยาจับกับ screen cells เมื่อเติม anti-human globulin serum (AHS) และ anti-IgG (anti-D) coated indicator cells ลงไป AHS จะจับกับแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ screen cells ในหลุม และจับกับ indicator cells เกิดเป็นชั้นของ indicator cells แผ่ในหลุมของ microplate ทดสอบประสิทธิภาพของวิธี SPMAT โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อหมู่เลือดต่างๆ ที่เจือจาง serial dilution และทดสอบกับแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกที่เคยตรวจพบผลบวกด้วยวิธี hemagglutination ในหลอดทดลอง (tube test) จำนวน 107 ตัวอย่าง รวมทั้งทดสอบความถูกต้องแม่นยำกับซีรัมของผู้บริจาคโลหิต จำนวน 10,995 ตัวอย่าง* ***ผลการศึกษา:*** *วิธี SPMAT ที่พัฒนาขึ้นใหม่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาแอนติบอดีดีกว่า วิธี tube test เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่างๆ ส่วนใหญ่ได้ผลความแรง (titer) สูงกว่าวิธี tube test 2-8 เท่า และตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก 91 ตัวอย่าง ขณะที่วิธี tube test ตรวจได้เพียง 83 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบเลือดผู้บริจาคโลหิต ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันจำนวน 10,856 ตัวอย่าง (98.7%)* ***สรุป:*** *SPMAT ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่เชื่อถือได้ การทดสอบทำได้ง่าย สะดวก ราคาไม่แพง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมจำนวนมาก เช่น ตรวจเลือดของผู้บริจาคโลหิต*

Key Words : ● *Solid phase* ● *Microplate* ● *Antiglobulin test* ● *RBC antibodies*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546;13:119-29.

ได้รับต้นฉบับ 10 เมษายน 2546 และให้ตีพิมพ์ 30 เมษายน 2546

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ นางสาวทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัม และผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพฯ 10330

การตรวจกรองเพื่อหาแอนติบอดีต่อหมู่เลือดบนเม็ดเลือดแดง เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบอื่นๆ นอกเหนือจาก anti-A, anti-B (unexpected antibodies) ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้อาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (natural antibody) หรือเกิดจากการกระตุ้นเมื่อได้รับเลือด (immune antibody) จากการศึกษาพบว่า ผู้บริจาคโลหิตประมาณร้อยละ 0.3 และผู้ป่วยร้อยละ 3 สามารถตรวจพบแอนติบอดีเหล่านี้ในน้ำเหลืองได้[1-4] ซึ่งแอนติบอดีบางตัวทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลายได้ ทำให้เกิดอาการตัวเหลืองแรกคลอดของทารกที่มีหมู่เลือดระหว่างแม่กับลูกเข้ากันไม่ได้ และทำให้ผู้ป่วยเกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือด ซึ่งอาจรุนแรงถึงทำให้เสียชีวิตได้ การตรวจกรอง (screen) และตรวจชนิด (identify) ของแอนติบอดีที่จำเพาะนี้มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย เช่นการจัดหาเลือดที่เหมาะสมที่จะรักษาอาการทารกตัวเหลืองแรกคลอด และช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยที่เกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือดได้ การตรวจกรองแอนติบอดีที่ใช้กันมานาน นิยมกันอย่างกว้างขวางคือ การดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง ในตัวกลางต่างๆ[5] เช่นในน้ำเกลือ ใน low ionic strength salt (LISS) solution ใช้ antiglobulin Coombs' test หรือใช้เม็ดเลือดแดง treat ด้วย proteolytic enzyme เป็นต้น ตัวกลางที่ต่างกันจะช่วยทำให้ตรวจพบแอนติบอดีต่อหมู่เลือดบางระบบได้ดี การทดสอบในหลอดทดลองจะอ่านผลโดยดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายสะดวก ผลเชื่อถือได้ แต่มีข้อด้อยคือ ต้องเขย่าก่อนอ่านผลซึ่งขึ้นกับประสบการณ์ของผู้ทำการทดสอบ อาจทำให้การแปลผลมีความแตกต่างกันตามบุคคล[6] และการอ่านผลไม่สามารถวัดเป็นปริมาณได้ทันที ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบที่ทำให้การอ่านผลสามารถมองเห็นด้วยตาและวัดเป็นปริมาณได้ทันที ในปี 1990 มีรายงานการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงใน microtube โดยใช้ gel หรือ glass-bead เป็น supporter เพื่ออ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า[7] อีกวิธีหนึ่งคือ solid phase microplate ซึ่งเริ่มมีรายงานครั้งแรกในปี 1976[8] การอ่านปฏิกิริยาผลบวกจะดูการแผ่ของเม็ดเลือดแดงในหลุมของ microplate ส่วนผลลบเม็ดเลือดแดงจะตกลงที่ก้นหลุมเป็นเม็ดกระดุม สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่า การตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธี solid phase microplate antiglobulin test (SPMAT) ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัย 2 หลักการ ได้แก่ การใช้ immunoglobulin (IgG) coated บน microplate[9,10] วิธีนี้ให้ซีรัมที่จะตรวจหาแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับ screening cells ใน microplate อันหนึ่ง ทำการอบและล้าง เติม antiglobulin serum ลงไปทำปฏิกิริยา จากนั้นดูดเซลล์ที่ทำปฏิกิริยานี้ไปใส่ใน microplate ที่มี IgG coated อยู่ นำไปปั่นปฏิกิริยาและการอ่านผลจะเกิดใน microplate นี้ อีกวิธีหนึ่งคือ นำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ตรวจกรองมา coated plate[11] ซึ่งถูก activate ด้วย poly-L-lysine, concovalin A หรือ anti-RBC antibody ไว้ก่อนแล้ว[12] แล้วเติมซีรัมที่จะทดสอบลงไปทำปฏิกิริยา เติม indicator cells ลงไป การอ่านผลจะเกิดใน plate นี้เลย ในปี 1996 F. Llopis และคณะ[13] ได้พัฒนาการเตรียม cell fixing buffer (CFB) มาใช้เจือจางเม็ดเลือดแดงเพื่อนำมา coated microplate เกิดเป็น RBC monolayer นำมาใช้ตรวจกรองและตรวจหาแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงได้สำเร็จ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงได้นำวิธีการ coat plate ด้วย CFB มาปรับปรุงและพัฒนาการเตรียม solid phase microplate เพื่อใช้ตรวจกรองแอนติบอดีในน้ำเหลืองของผู้บริจาคโลหิต เนื่องจากน้ำยาต่างๆ เตรียมได้ง่าย ราคาไม่แพง วิธีการทดสอบทำได้ง่ายสะดวก และเหมาะสมสำหรับทดสอบตัวอย่างจำนวนมาก

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาการเตรียม SPMAT เพื่อใช้ตรวจกรองแอนติบอดีในเลือดผู้บริจาคโลหิต และได้ศึกษาความคงทน (stability) ของ RBC monolayer บน SPMAT ด้วยเพื่อทำเป็นน้ำยาสำเร็จรูป

2. ประเมินประสิทธิภาพของ SPMAT ที่พัฒนาขึ้น

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมน้ำยา

1. การเตรียม RBC monolayer plate

ล้าง เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ตรวจกรองแอนติบอดี เช่น screening cells หรือ pool O cells ด้วย น้ำเกลือ 3-4 ครั้ง ล้างอีก 1 ครั้งด้วยน้ำยา cell fixing buffer (CFB) เตรียมเป็น 0.2% (vol/vol) ใน CFB โดยเตรียมตามวิธีของ F. Llopis[13] ซึ่งประกอบด้วย glucose 0.1 M, NaCl 0.07 M, boric acid 0.02 M, trisodium citrate 0.035 M, tetrasodium EDTA 0.002 M ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร pH 7.2-7.3 นำ 0.2% screening cells ใน CFB หยดลงใน polystyrene microplate (U-shape) หลุมละ 50 μL นำไปปั่นที่ 450 g นาน 2 นาที เม็ดเลือดแดงจะแผ่ในหลุม ปิด parafilm ใส่ในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษซับรอง และชุบ PBS เพื่อให้มีความชื้น (moist chamber) เก็บในตู้อุณหภูมิ 4 ° ซ

2. การเตรียม indicator cells (IgG anti-D sensitized cells)

ทดสอบหา dilution ที่เหมาะสมของ anti-D ซึ่งเมื่อ sensitized กับ R1r cells แล้วให้ผลบวกอ่อน (weak) โดยทำการเจือจาง IgG anti-D ในน้ำเกลือที่มี 2% bovine serum albumin (BSA) นำมาผสมกับ 5% R1r cells (pool 2 cells) ในสัดส่วนเท่ากัน incubate ที่ 37 ° ซ นาน 30 นาที ล้าง 4 ครั้งในน้ำเกลือ เตรียมเป็น 2%ใน Alsever's solution indicator cells สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 ° ซ ก่อนใช้งานนำมาเจือจางเป็น 0.2% ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0-7.2

3. การเตรียมน้ำยา anti-human globulin serum (AHS) (polyspecific)

ใช้น้ำยา AHS ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ทำการทดสอบหา dilution ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในงาน SPMAT โดยการทำ cross-titration ระหว่าง anti-D (dilution ต่างๆ) sensitized R1r cells กับ dilution ของ AHS ใน microplate พบว่า dilution ที่เหมาะสม คือ 1:8 ดังนั้นน้ำยา AHS ที่ใช้ใน SPMAT จะเจือจาง 1:8 ใน PBS ที่มี 2% BSA

4. การเตรียมน้ำยา (LISS) และ PBS pH 7.0-7.2[14]

5. สำหรับวิธี tube test ใช้น้ำยา anti human globulin serum, Coombs control cells และ screening cells ของศูนย์บริการโลหิตฯ

การตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธี SPMAT

1. นำ RBC monolayer plate มาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ล้าง 4 ครั้งด้วย PBS pH 7.0-7.2

2. หยด 100 μL ของ LISS และ 100 μL ซีรัมหรือพลาสมาที่จะใช้ทดสอบลงในแต่ละหลุมของ microplate ตามลำดับ

3. incubate ที่ 37 ° ซ นาน 20 นาที

4. ดูดส่วนผสมของ LISS-ซีรัมใน microplate ทิ้ง และล้างด้วย PBS ใช้เครื่อง semi-automatic microtitration plate washer (Immucor INC, USA) หรือล้าง 5 ครั้งด้วย multichannel pipette

5. หยด 100 μL ของ AHS และ 50 μL ของ 0.2% indicator cells

6. ปั่น microplate ที่ 600 g นาน 2 นาที

การอ่านผล ดูด้วยตาเปล่าใต้แสงไฟ (illuminated surface) วิธีการทดสอบและการอ่านผลดังแสดงในรูปที่ 1

ผลบวก จะเห็น indicator cells จับแผ่ในหลุม ผลบวกที่อ่อนลงมาจะมี indicator cells แผ่ในหลุมและมีบางส่วนตกเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม

ผลลบ จะเห็น indicator cells ตกลงที่ก้นหลุมเป็นเม็ดกระดุม

หมายเหตุ แต่ละ microplate ที่ทำการทดสอบ ทำ positive control (IgG-anti-D dilution 1:32) และ negative control (ซีรัมที่ไม่มีแอนติบอดี) ควบคู่ไปด้วย

วิธีการทดลอง

1. การศึกษา ความคงทน (stability) ของ RBC monolayer plate เตรียม RBC monolayer plate สำหรับใช้ประมาณ1 เดือน จำนวน 5 ชุด เพื่อทดสอบกับ anti-D, anti-E, anti-Fy^a, anti-Jk^a, anti-K และ anti-Mi^a ที่มี titer < 32 โดยนำแอนติบอดีนี้มาเจือจาง serial two-folddilution แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับ microplate ที่เตรียมขึ้นใหม่ 1 ชุด จากนั้นทุก 1 สัปดาห์ นำ microplateออกมา 1 ชุด มาทดสอบกับแอนติบอดีจนครบ 4 สัปดาห์ อ่านผลแอนติบอดีแต่ละตัวที่ dilution สุดท้ายที่ให้ผลบวก

2. การประเมินประสิทธิภาพของ SPMAT ที่พัฒนาใหม่ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี tube test ใน AABB Technical Manual[15] ทำการศึกษาดังนี้

2.1 หา antibody titer นำแอนติบอดีที่ทราบชนิดแล้ว เช่น anti-D, anti-E และอื่นๆ จำนวน 12 ชนิดมาเจือจาง serial two-fold dilution ด้วย PBS นำไปทดสอบกับเซลล์ที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีนั้นๆ อ่านผลความแรง (titer) คือส่วนกลับของ dilution สุดท้ายที่ให้ผลบวก

2.2 ทดสอบกับแอนติบอดีต่างๆ ที่ได้จากซีรัมผู้ป่วย และผู้บริจาคโลหิต ที่เคยตรวจพบด้วยวิธี tube test จำนวน 107 ตัวอย่าง เป็นแอนติบอดีพวก IgG จำนวน 51 ตัวอย่าง และอีก 57 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีชนิด IgM และถูกเก็บแช่แข็งไว้ นำมาละลายปั่นแยกตะกอนทิ้ง นำมาทดสอบกับ pool O cells

2.3 โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างซีรัมของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯในงานที่ทำประจำวัน จำนวน 10,995 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา

1. การศึกษาความคงทนของ RBC monolayer plate

ตารางที่ 1 พบว่า แอนติบอดีทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ทดสอบ คือ anti-D, anti-E, anti-Fy^a, anti-Jk^a, anti-K และ anti-Mi^a ให้ผล titer เช่นเดียวกันในทุกสัปดาห์ที่ทำการทดสอบ ดังนั้น microplate ที่เตรียมขึ้นนี้ เมื่อเก็บที่ 4°C สามารถใช้งานได้ถึง 4 สัปดาห์ โดยแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2. การประเมินประสิทธิภาพของ SPMAT ที่พัฒนาใหม่

2.1 ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษา antibody titer ของแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบ 12 ชนิด จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าส่วนใหญ่ วิธี SPMAT ตรวจได้ความแรงของแอนติบอดีต่างๆ สูงกว่าประมาณ 2 ถึง 8 dilution

ตารางที่ 1 Stability study of RBC monolayer on coated plate

Antibody specificity	Antibody titer				
	Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4
D	32	32	32	32	32
E	32	32	32	32	32
Mi^a	16	16	16	16	16
Jk^a	1	1	1	1	1
Fy^a	8	8	8	8	8
K	8	8	8	8	8

ตารางที่ 2 Comparison of the titer of the standard tube test. and SPMAT

Antibody specificity	N	Titer	
		Tube Test	SPMAT
D	3	128	1024
		256	2048
		256	1024
E	2	4	64
		32	128
C	1	32	256
C	1	64	256
Fy^a	2	4	8
		16	64
Fy^b	2	4	4
		64	128
Jk^a	2	1	1
		64	256
Jk^b	1	4	4
K	2	4	8
		128	512
Mi^a	6	8	16
		8	32
		16	32
		16	32
		32	64
		32	256
Le^a	1	4	2
Le^b	1	1	2

เช่นเมื่อทดสอบกับ anti-D 3 ตัวอย่าง วิธี tube test ตรวจได้ titer 128, 256, 256 ขณะที่วิธี SPMAT ตรวจได้ titer 1024, 2048 และ 1024 ส่วนแอนติบอดีตัวอื่นๆ ในระบบ Rh, Kell และ Mi^a ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน สำหรับแอนติบอดีที่ความแรงต่ำ (weak) เช่น anti-Fy^b, anti-Jk^a และ anti-Jk^b อย่างละ 1 ตัวอย่าง แม้ titer จะเท่ากัน แต่วิธี SPMAT จะให้ผลปฏิกิริยาแรงกว่า โดยอ่านปฏิกิริยาได้ 1+ ด้วยตาเปล่าที่ dilution สุดท้าย ขณะที่วิธี tube test ต้องดูในกล้องจุลทรรศน์ อย่างไรก็ตาม anti-Le^a 1 ราย ให้ผลวิธี tube (titer = 4) ได้ดีกว่า SPMAT (titer = 2)

2.2 ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3 Ability to detect clinically significant antibodies from donors and patients (previously identified by Tube Test)

Antibody specificity	Number Tested	Tube Test	SPMAT
D	13	12	13
E+Mi^a	16	15	16
E+Mi^a+unid.	5	4	5
E+unid.	1	1	1
E+c+Mi^a	2	2	2
E+c	1	1	1
E+c+Fy^b	1	1	1
C	1	1	1
C	2	1	2
Jk^a	1	1	1
Di^a	1	1	1
Di^b	1	1	1
S	3	3	3
Tj^a	2	2	2
Total	**51**	**47 (92.2%)**	**51 (100%)**

ในการตรวจแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากซีรัมผู้ป่วย และเป็นแอนติบอดีชนิด IgG แอนติบอดีเหล่านี้บางตัวเก็บแช่แข็งไว้นานร่วม 10 ปี นำมาละลายแล้วทดสอบกับ pool O cells พบว่าแอนติบอดีจำนวน 51 ตัวอย่าง วิธี SPMAT ตรวจได้ทั้ง 51 ตัวอย่าง (100%) วิธี tube test ตรวจได้ 47 ตัวอย่าง (92.2%) ตรวจไม่ได้ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ anti-D, anti-E, anti-E+Mi^a และ anti-c ซึ่งเป็น weak แอนติบอดี

ตารางที่ 4 แสดงการตรวจแอนติบอดีที่ไม่ค่อยมีความสำคัญทางคลินิก ได้จากซีรัมผู้บริจาคโลหิต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีชนิด IgM จำนวน 56 ตัวอย่าง วิธี tube test ตรวจได้ 36 ตัวอย่าง (64.3%) วิธี SPMAT ตรวจได้ 40 ตัวอย่าง (71.4%) anti-Mi^a เป็นแอนติบอดีที่ตรวจได้มากที่สุดคือ 22 ตัวอย่างจากทั้งหมด 23 ตัวอย่าง เนื่องจากมักเป็นแอนติบอดีชนิด IgM ร่วมกับ IgG anti-P_1 จำนวน 14 ตัวอย่าง วิธี tube test ตรวจพบเพียง 1 ตัวอย่าง วิธี SPMAT ตรวจได้ 2 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับ anti-Le^a, anti-Le^b และ anti-Le^a +anti-Le^b วิธี tube test ตรวจพบ 2, 5 และ 5 ตัวอย่าง ส่วนวิธี SPMAT ตรวจพบ 2, 6 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ ดังนั้นวิธี SPMAT จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจแอนติบอดีต่างๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิกดีกว่าวิธี tube test โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีชนิด IgG

2.3 ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบตัวอย่างซีรัมในผู้บริจาคโลหิตจำนวน 10,995 ตัวอย่าง วิธี SPMAT และวิธี tube test ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกันคือ ให้ผลลบเหมือนกัน 10,807 ตัวอย่าง (98.3%) ผลบวกเหมือนกัน 49 ตัวอย่าง (0.45%) รวมเป็นร้อยละ 98.7 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด จากทั้ง 2 วิธี ได้นำมาตรวจกรองซ้ำ และ identify แอนติบอดีโดยวิธี tube

ตารางที่ 4 Ability to detect less clinically significant antibodies in donors (previously identified by Tube Test)

Antibody specificity	Number Tested	Tube Test	SPMAT
Mi^a	23	22	22
P_1	14	1	2
Le^a	4	2	2
Le^b	6	5	6
Le^a +Le^b	8	5	7
H	1	1	1
Total	**56**	**36 (64.3%)**	**40 (71.4%)**

ตารางที่ 5 Testing sera from blood donors (SPMAT vs Tube test)

			SPMAT				
			Positive		Negative	Total	
			ID	Unid			
Tube Test	Positive	ID	39	-	45	84	121
		Unid	-	10	27	37	
	Negative		27	40	10,807	10,874	
	Total		66	50	10,879	10,995	
			116				

Positive by both methods 49 samples (0.45%)

Negative by both methods 10,807 samples (98.3%)

False positive by SPMAT 50 in 116 samples (0.45%)

False positive by tube test 37 in 121 samples (0.34%)

test ถ้าถือว่ารายที่ได้ตรวจซ้ำแล้วให้ผลลบ หรือไม่สามารถตรวจชนิดแอนติบอดีได้ เกิดจาก non-specific เป็นผลบวกปลอม วิธี SPMAT ให้ผลบวก 116 ตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจชนิดแอนติบอดี 50 ตัวอย่าง คิดเป็นผลบวกปลอมร้อยละ 0.45 ส่วนวิธี tube test ให้ผลบวก 121 ตัวอย่าง ไม่สามารถตรวจชนิด แอนติบอดี 37 ตัวอย่าง คิดเป็นผลบวกปลอมร้อยละ 0.34 นอกจากนี้มี 72 ตัวอย่างที่วิธี tube test ให้ผลบวก แต่วิธี SPMAT ให้ผลลบ ตรวจชนิดแอนติบอดีได้ 45 ตัวอย่าง และมี 67 ตัวอย่างที่วิธี SPMAT ให้ผลบวก แต่วิธี tube test ให้ผลลบ โดยสามารถตรวจชนิดแอนติบอดี ได้ 27 ตัวอย่าง แอนติบอดีที่ตรวจชนิดได้ ได้แก่ anti-Le^a, anti -Le^b, anti-Le^a+anti-Le^b anti-P_1 และ anti-Mi^a

นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้ยังได้เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการทดสอบของทั้ง 2 วิธี ต่อการทดสอบ 1 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าวิธี SPMAT ราคาค่าน้ำยาประมาณ 1.15 บาท รวมกับค่า plate 1.50 บาทต่อหลุม รวมเป็น 2.65 บาทต่อการทดสอบ ส่วนวิธี tube test ค่า

ตารางที่ 6 Reagent cost Per screen (SPMAT vs Tube test)

	Tube Test	**SPMAT**
Test Tube or plate (96)	9	1.5
Screening cell 10 mL. = 70 บาท	= 0.35 บาท/test	= 0.025 บาท/test
LISS 10 mL. = 100 บาท	-	= 1 บาท/test
AHS 10 mL. = 100 บาท	= 1.0 บาท/test	= 0.083 บาท/test
CCC 10 mL. = 70 บาท	= 0.35 บาท/test	= 0.035 บาท/test
PBS 3.76 บาท/L	= 0.045 บาท/test	= 0.0094 บาท/test
Total	**1.75+(9) = 10.75 บาท/test**	**1.15+(1.5) = 2.65 บาท/test**

น้ำยา 1.75 บาท รวมค่า test tube 9 บาท เป็น 10.75 บาทต่อการทดสอบ ซึ่งวิธี SPMAT ใช้งานแล้วทิ้ง plate เลย ส่วนวิธี tube test ต้องคิดค่าล้างหลอด และหลอดทดลองก็ชำรุดแตกไปบ้าง อย่างไรก็ตาม SPMAT ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ พัฒนาขึ้นก็มีราคาถูกกว่าที่บริษัทขาย ซึ่งราคาประมาณ 10-15 บาทต่อการทดสอบ

วิจารณ์

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ได้พัฒนา SPMAT ขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการตรวจกรองหาแอนติบอดีในโลหิตบริจาค โดยได้นำวิธีการของ F. Llopis และคณะ มาปรับปรุงพัฒนา วิธีนี้ screening cells จะถูกเจือจางใน CFB สำหรับนำมา coated บน microplate จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า วิธีนี้ใช้ได้ผลดีน่าพอใจ RBC monolayer ที่เตรียมขึ้นมีความคงทน (stability) ดี เมื่อเก็บที่ 4 °ซ สามารถเก็บไว้ใช้งานได้นาน 4 สัปดาห์ โดยแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่ง F. Llopis และคณะ อธิบายว่าความคงทนของ RBC monolayer ขึ้นกับความเข้มข้นของ boric acid ใน CFB ถ้าความเข้มข้นลดลง ความคงทนของ RBC monolayer จะลดลงด้วย อย่างไรก็ตามเขาไม่สามารถอธิบายกลไกที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะบน microplate[13] การพัฒนาครั้งนี้ได้ใช้ PBS แทนการใช้ unbuffer saline ในขั้นตอนการล้าง microplate wells และพบว่า PBS ทำให้ RBC monolayer มีความคงทนดีกว่า การทดสอบเกิดผลบวกปลอมน้อย และช่วยให้ตรวจพบแอนติบอดีได้ดีกว่าการใช้ unbuffer saline

การทดสอบ antibody titration วิธี SPMAT ส่วนใหญ่ให้ผลปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่างๆ มีความแรง (titer) มากกว่าวิธี tube โดยแอนติบอดีที่ทดสอบส่วนใหญ่ เช่น anti-D, anti-E เป็นต้น เป็นแอนติบอดีชนิด IgG สำหรับ anti-Le^a ที่วิธี tube ให้ผลแรงกว่าวิธี SPMAT นั้น เพราะ anti-Le^a นี้เป็นแอนติบอดีชนิด IgM อีกทั้งผลการทดสอบกับแอนติบอดีต่างๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิกที่ตรวจพบในอดีตด้วยวิธี tube test วิธี SPMAT ตรวจพบแอนติบอดี 91ตัวอย่าง มากกว่าวิธี tube test ซึ่งพบเพียง 83 ตัวอย่าง เมื่อแยกเป็นแอนติบอดีชนิด IgG วิธี SPMAT ตรวจพบ 51 ตัวอย่าง วิธี tube test ตรวจพบ 47 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) ขณะที่แอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgM ร่วมกับ IgG วิธี SPMAT ตรวจพบ 40 ตัวอย่าง วิธี tube test ตรวจพบ 36ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวได้ผลเช่นเดียวกันกับที่เคยมีรายงานไว้[9-11,13] วิธี SPMAT จึงมีความไวในการตรวจแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีชนิด IgG ได้ดีกว่าวิธี tubetest ทั้งนี้เพราะ indicator cells ที่ใช้เป็น anti-IgGcoated cells ซึ่งจะจับกับ IgG แอนติบอดีโดยตรง อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM

ได้เช่นกัน เนื่องจาก anti-IgG ในน้ำยา AHS (polyspecific) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแอนติบอดีต่อ Fc portion ของแอนติบอดีแล้ว ยังมีแอนติบอดีต่อ light chain ของ immunoglobulin ประกอบอยู่ด้วย ทำให้สามารถเกิด cross reaction ระหว่าง light chain ของแอนติบอดีชนิด IgM ที่จับบน RBC monolayer กับ light chain ของ IgG anti-D ที่จับบน indicator cells เกิดเป็นผลบวกได้ เหตุผลอีกประการหนึ่งที่เกิดได้คือ บน indicator cells มีแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดี IgM นั้น ทำให้แอนติบอดี IgM ที่จับบน RBC monolayer สามารถจับกับแอนติเจนบน indicator cells ด้วย จึงให้ผลบวกได้เช่นกัน การที่วิธี SPMAT ตรวจแอนติบอดีได้ดีกว่า วิธี tube test นั้น ส่วนหนึ่งอาจเพราะวิธี SPMAT ใช้สัดส่วนของซีรัมต่อเซลล์ (100:1) ซึ่งมากกว่าวิธี tube test (80:1) จึงทำให้แอนติบอดีจับได้ดีกว่า ในการศึกษาพบว่าแอนติบอดีจำนวนหนึ่งซึ่งเคยให้ผลบวกด้วยวิธี tubeในอดีต แต่ครั้งนี้ตรวจไม่พบนั้นสาเหตุเกิดจาก การเก็บแอนติบอดีไว้นานๆ แอนติบอดีบางตัวอาจเสื่อมสลายไปได้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจได้[5] นอกจากนี้ ความแรงของ screening cells ที่ใช้ในแต่ละครั้งของการทดสอบก็แตกต่างกันด้วย

การตรวจแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตโดยวิธี SPMAT ให้ผลสอดคล้องกับวิธี tube test ถึงร้อยละ 98.7 มีแอนติบอดีบางตัวตรวจพบโดยวิธี SPMAT แต่วิธี tube test ให้ผลลบ ตรงกันข้ามแอนติบอดีบางตัวตรวจพบได้โดย วิธี tube แต่วิธี SPMAT ให้ผลลบ ซึ่งผลดังกล่าวไม่ขึ้นกับความไวของวิธีการทดสอบนั้นๆ ซึ่ง Engelfriet และ Reesink กล่าวว่า ไม่มีวิธีการทดสอบวิธีใดวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ทั้งหมด[6] และการที่วิธี SPMAT ให้ผลบวกปลอม (0.45%) มากกว่าวิธี tube (0.34%) อาจเนื่องจากวิธี SPMAT มีความไวในการตรวจแอนติบอดีดีกว่าดังกล่าวแล้ว ดังนั้นวิธี SPMAT จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจหาแอนติบอดีในเลือดผู้บริจาคโลหิต เพราะมีความไวในการตรวจหาแอนติบอดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด IgG ได้ดีและให้ผลบวกปลอมไม่แตกต่างจากวิธี tube test การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทดลองตรวจชนิดแอนติบอดี จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ anti-D, anti-E, anti-Mi[a] และ anti-Fy[a] พบว่าได้ผลดี อ่านผลได้ง่าย ดังนั้นวิธี SPMAT สามารถจะนำไปตรวจหาและตรวจชนิดแอนติบอดีในผู้ป่วยได้ด้วย ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

สำหรับน้ำยาและเซลล์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ วิธี SPMAT ใช้ปริมาตรน้อยกว่าวิธี tube ปริมาตร screen cells ที่ใช้ในการทดสอบวิธี SPMAT เท่ากับวิธี tube test คือ 50 μL แต่ใช้เซลล์ความเข้มข้น 0.2% วิธี tube test ใช้เซลล์เข้มข้น 3% ดังนั้นเซลล์ทดสอบที่ใช้ในการทดสอบวิธี tube test 1 ราย สามารถใช้ทดสอบวิธี SPMAT 15 ราย เช่นเดียวกับน้ำยา AHS วิธี SPMAT ใช้น้ำยาเจือจาง 1:8 รวมทั้งน้ำยาอื่นๆ ก็ใช้น้อยลงด้วย ดังนั้นวิธีนี้ จึงช่วยประหยัดค่าน้ำยาต่างๆ ได้มากขึ้นด้วย นอกจากนี้การอ่านผลวิธี SPMAT จะทำได้รวดเร็วกว่าวิธี tube test อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าชัดเจน และสะดวก การอ่านผลวิธี tube test ต้องมีการเขย่าหลอดก่อนอ่าน รายที่สงสัยต้องตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ และประสบการณ์ของผู้ทำการทดสอบเป็นอย่างมาก ความแรงในการเขย่าหลอดก่อนอ่านในแต่ละครั้งแต่ละคนอาจไม่เท่ากัน ทำให้การอ่านผลมีความผิดพลาดได้มากถึงร้อยละ 20 โดยเฉพาะในการตรวจกรองตัวอย่างจำนวนมากๆ[6]

สรุป

วิธี SPMAT ที่ศูนย์บริการโลหิตฯ พัฒนาขึ้น ให้ผลในการตรวจกรองแอนติบอดีได้ดีเช่นเดียวกันกับวิธี tube test มีประสิทธิภาพในการตรวจพบแอนติบอดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีชนิด IgG ได้ดีกว่าวิธี tube test อ่านผลได้ง่ายด้วยตาเปล่า และอ่านเป็นปริมาณได้ทันที ผลบวกและผลลบแตกต่างกันชัดเจน ราคาไม่แพง ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจกรองเลือดผู้บริจาคโลหิตได้เป็นอย่างดียิ่ง อีกทั้งสามารถนำเทคนิคนี้ไปพัฒนาตรวจหาชนิดของแอนติบอดีได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. *ศศิธร เพชรจันทร นฤมล สถิโรภาส อุบล จรูญเรืองฤทธิ์. วิธีแก้ปัญหาเมื่อผู้ป่วยมี Red cell antibodies แล้วต้องใช้เลือด. ในคำบรรยาย การประชุมทางวิชาการ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 2541;28:92-119.*
2. *Sakuldamrongpanich T. Blood Typing and Reagents Preparation in Thailand. In: Proceedings, The Third Red Cross and Red Crescent Symposium Blood Programs in the Asian Region. Securing Safe Blood (III). November 26-30, 2001: 216-9.*
3. *Roualt CL. Appropriate pretransfusion testing. In: Pretransfusion testing for the 80's. Washington DC: Am Assoc Blood Banks, 1985.*
4. *Schrem A, Flegel WA. Comparison of Solid-Phase Antibody Screening Tests with Pooled Red Cells in Blood Donors. Vox Sang 1996;71:37-42.*
5. *Brecher Mark E, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda, Maryland. Am Assoc Blood Banks, 2002:687-96.*
6. *International Forum: What is the best technique for the detection of red cell alloantibodies? Vox Sang 1995;69:292-300.*
7. *Lapierre Y, Rigel D, Adams J, Josef D, Meyer F, Gerber S, Drot C. The gel-test: A new way to detect red cell antigens-antibody reactions. Transfusion 1990;30:109-13.*
8. *Rosenfield RE, Kochwa S, Kaczera Z. Solid phase serology for the study of human erythrocytic antigen-antibody reactions. Proc 15th Congr Int Soc Blood Transfusion, Paris, 1976:27-33.*
9. *Rachel JM, Sinor LT, Beck ML, Plapp FV. A solid-phase antiglobulin test. Transfusion 1985;25:24-6.*
10. *Uthemann H, Poschmann A. Solid phase antiglobulin test for screening and identification of red cell antibodies. Transfusion 1990;30:114-6.*
11. *Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM, Beck ML, Coenen WM, Bayer WL. A solid phase antibody screen. Am J Clin Pathol 1984;82:719-21.*
12. *Scott M. The principles and applications of solid-phase blood group serology. Transfus Med Rev 1991; 5:60-72.*
13. *Llopis F, Carbonell-Uberos F, Planelles MD, Montero M, Plasencia I, Carrillo C. A new microplate red blood cell monolayer technique for screening and identifying red blood cell antibodies. Vox Sang 1996;70:152-6.*
14. *Brecher Mark E, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda, Maryland. Am Assoc Blood Banks, 2002: 666, 688.*
15. *Brecher Mark E, ed. Technical manual. 14th ed. Bethesda, Maryland. Am Assoc Blood Banks, 2002: 688-9.*

Development of A Solid Phase Microplate Antiglobulin Test for Detection of Red Blood Cell Antibodies

Tasanee Sakuldamrongpanich, Jintana Tubrod, and Sarika Mekchay

Antiserum and Standard cell Preparation, The National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330

Background and objectives: *A solid phase microplate antiglobulin test (SPMAT) for detection of red blood cell antibodies has been developed. Instead of agglutination, positive reactions are indicated by the adherence of sensitized red cells over the entire surface of the microplate wells, and negative reactions produce discrete buttons of red cells in the center of the wells. The performance of this method for detecting antibody to red blood cells was compared with the standard antiglobulin tube test.* ***Materials and methods:*** *The screening cells were fixed on the microplate wells (RBC monolayer) using a cell fixing buffer. Reaction between serum antibody and reagent red cells were detected by adding of anti-human globulin serum and anti-IgG coated indicator cells. The efficiency of the SPMAT was determined by testing with serial dilutions of various red cell antibodies and with 107 clinically significant antibodies that have been previously identified by hemagglutination tube test. The accuracy was tested against 10,995 routine blood donor sera.* ***Results:*** *The SMPAT gave good efficiency for detecting antibodies to red blood cell antigens. Compared with the tube test, the method was in most cases two to eight times more sensitive in antibody titration and detected 91 clinically significant antibodies where as tube test detected only 83 antibodies. The SPMAT and tube test showed an excellent agreement in 10856 (98.7%) of samples tested.* ***Conclusions:*** *The SPMAT provides a reliable, handy and inexpensive screening of antibodies. This method appears to be suitable to screen large series of blood donor samples.*

Key Words : ● *Solid phase* ● *Microplate* ● *Antiglobulin test* ● *RBC antibodies*

Thai J Hematol Transf Med 2003;13:119-29.

ภัยสังคม

เมื่อสังคม อุดมดี มีชนชั้น
เอื้อเฟื้อกัน กอปรกรรม ทำกุศล
ต่างมีศีล มีธรรม ประจำตน
เรื่องของชน ต่างชั้น มีขั้นตอน
คนเศรษฐี กลับจน ตนทำพลาด
คนจนอาจ รวยได้ ไม่เหมือนก่อน
เป็นเรื่องกรรม ของเขา เจ้าปากบอน
พูดยอกย้อน ใส่ไฟ ในสังคม

หลวงตาวัดบวรฯ