

นิพนธ์ต้นฉบับ

แอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยรับโลหิตซึ่งตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน และวิธีเจล: การศึกษาเพื่อพัฒนางานบริการโลหิต

กัญญา ดาวลี¹ และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ²

¹ศูนย์คลังเลือดกลาง โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคเจลมาใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดีอย่างแพร่หลาย วัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้ เพื่อศึกษาความชุก ชนิดของแอนติบอดี และเปรียบเทียบผลการตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างผู้ป่วยรับโลหิตระหว่างวิธี Standard tube test (STT) และวิธี Gel agglutination (DG Gel: Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) ได้ตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างผู้ป่วยรับโลหิตโดยไม่ซ้ำตัวบุคคล 750 ราย พบแอนติบอดีด้วย วิธี STT 61 ราย (8.13%), DG Gel 55 ราย (7.33%) ตรวจพบแอนติบอดีสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี 54 ราย ใน 750 ราย ได้แก่ anti-Mi^a, anti-E, anti-P₁, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-Le^a+Le^b, anti-Jk^a, anti-c, anti-E+anti-Mi^a, anti-E+anti-c, anti-Le^b+anti-Mi^a, anti-E+anti-Fy^b, anti-Le^a+anti-P₁ และ anti-Le^a+Le^b+anti-P₁ จำนวน 28, 6, 4, 3, 1, 1, 2, 1, 2, 2, 1, 1, 1 และ 1 ราย ตามลำดับ ตรวจพบแอนติบอดีด้วย STT วิธีเดียว 7 ราย ได้แก่ anti-P₁ 5 ราย และ anti-Le^a 2 ราย ให้ผลบวกเฉพาะวิธี DG Gel 1 ราย พบเป็น unidentified antibody แอนติบอดีที่พบในผู้ป่วยทั้ง 61 ราย ประกอบด้วย anti-Mi^a ร้อยละ 50.82 (31 ราย) anti-P₁ ร้อยละ 18.03 (11 ราย) Lewis antibodies ร้อยละ 16.39 (10 ราย) anti-E ร้อยละ 18.03 (11 ราย) anti-c ร้อยละ 4.92 (3 ราย) anti-Jk^a ร้อยละ 3.28 (2 ราย) และ anti-Fy^b ร้อยละ 1.64 (1 ราย) วิธี DG Gel มีค่า sensitivity, specificity, false positive, false negative, positive predictive valve (PPV), negative predictive valve (NPV) และ efficiency เป็นร้อยละ 98.2, 99.0, 1.8, 1.0, 98.2, 99.0 และ 98.9 ตามลำดับ การศึกษานี้พบว่า STT มีความไวสูงกว่า DG Gel ($p < 0.001$) โดยมีข้อจำกัดในการตรวจหา anti-P₁ และ Lewis antibodies บางตัว ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยในประชากรไทย เนื่องจากมีความชุกของหมู่เลือด P₁ negative สูงถึงร้อยละ 77 และ Le(a-b-) ร้อยละ 30 ถึงแม้ anti-P₁ และ Lewis antibodies ถูกจัดเป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย แต่ในกรณีทำปฏิกิริยาได้ที่ 37°C ก็อาจเป็นสาเหตุการเกิด transfusion complication ได้

Key Words : ● Red cell alloantibodies ● Transfused patient ● Antibody screening ● Standard tube test ● Gel test

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2556;23:269-76.

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคการตรวจหาแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดงมีหลายวิธี เช่น Standard tube test (STT) , Solid-phase technology และ Column agglutination technology (CAT) ซึ่งเป็น plastic card มี 6-8 microtubes แต่ละ microtube ประกอบด้วย chamber และ column ภายใน column มี Sephadex gel (ID - Card, DiaMed AG), Dextran gel (Diagnostic Grifols), glass beads (Ortho-Clinical Diagnostics) บรรจุอยู่ทำหน้าที่เป็นตัวกลาง กรองเม็ดเลือดแดงที่มีการจับกลุ่ม และเป็นตัวแยกระดับของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หลักการเลือกวิธีการตรวจ

หาแอนติบอดีนั้นควรคำนึงถึงวิธีที่สามารถตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดี เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการตรวจไม่นาน และราคาไม่สูงเกินไป วิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่เป็นวิธีมาตรฐาน คือ Multiple phases antiglobulin standard tube test¹ ซึ่งทดสอบปฏิกิริยาต่อเนื่อง 3 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนแรก ที่อุณหภูมิห้อง (20-24°C) เพื่อตรวจหา IgM antibody ขั้นตอน 2 ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อตรวจหา warm IgM antibody และ/หรือ IgM cold antibody ที่ยังคงทำปฏิกิริยาที่ 37°C ได้ antiglobulin phase สำหรับ IgG antibody และ/หรือ IgM cold antibody/complement ที่ยังคงเกิดปฏิกิริยา ส่วนวิธี CAT เป็นวิธีทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงใน microtube โดยให้แอนติบอดีในซีรัมทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงบนเจล

ด้วยปริมาณงานที่เพิ่มขึ้น คลังเลือด โรงพยาบาลขอนแก่นได้นำ

ได้รับต้นฉบับ 28 พฤษภาคม 2556 รับลงตีพิมพ์ 18 กรกฎาคม 2556

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ รศ.ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail address: yupaurw@kku.ac.th

วิธีเจล (Gel Coombs card / LISS Coombs card : DG gel (Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) ซึ่งภายใน column มี AHG reagent บรรจุอยู่ มาใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดีของผู้ป่วย (antibody screening test) ที่ขั้นตอน antiglobulin phase เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตชนิด IgG ร่วมกับ standard tube test ซึ่งทดสอบปฏิกิริยาเฉพาะที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และในรายที่การตรวจคัดกรองแอนติบอดีให้ผลบวก จะตรวจหาชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วยบางรายเท่านั้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างผู้ป่วยรับโลหิตที่โรงพยาบาลขอนแก่นระหว่าง วิธีเจล (DG gel: Diagnostic Grifols) และวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน พร้อมทั้งศึกษาค่าความซุกและชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วยรับโลหิต

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างที่ศึกษา

ซีรัมของผู้ป่วยที่เหลือจากการทดสอบประจำวัน จากผู้ป่วยที่มีประวัติรับโลหิตครั้งที่ 2 ขึ้นไป และมีระยะเวลาห่างจากการรับเลือดครั้งก่อนหน้า ไม่น้อยกว่า 21 วัน ระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - มกราคม 2556 จำนวน 750 ตัวอย่าง โดยเป็นผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำรายกัน

2. เซลล์และน้ำยา ประกอบด้วย

2.1 Screening O1, O2 cells (Lot No : 55093, 55103, 55110, 55120 และ 56010), Panel cells (Lot No : 55090, 55100, 55110, 55120 และ 56010) ซึ่งมีแอนติเจนของหมู่เลือดระบบต่างๆที่สำคัญได้แก่ D, C, E, c, e, M, N, S, s, P₁, Le^a, Le^b, Mi^a, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, K, k, Di^a, Di^b และ Xg^a, Polyspecific antihuman globulin reagent, Coombs control cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

2.2 DG Gel (Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain.)

ลักษณะเป็น plastic card 8 หลุม มี polymerised dextran gel ทำหน้าที่เป็นตัวกลางบรรจุอยู่ใน column ประกอบด้วย Neutral gel (ภายใน column บรรจุ polymerised dextran gel และ buffered salt solution ไม่มี AHG reagent) และ LISS/Coombs gel ซึ่งภายใน column มี AHG reagent

2.3 Typing antiserum ประกอบด้วย commercial antisera ได้แก่ anti-P₁, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-Fy^a, anti-Fy^b, anti-C, anti-e, anti-S, anti-s, anti-K, anti-k (DiaMed GmbH, Switzerland), anti-Le^a, anti-Le^b (LORNE LABS. LOWER EARLEY. RG6 4 UT, U.K.), anti-M, anti-N, anti-E, anti-c (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) และ anti-Mi^a ซึ่งได้จากพลาสมาของผู้บริจาคโลหิต หมู่ AB ที่เก็บแช่แข็งไว้เป็น

aliquot

3. เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ WADiana Compact (Automatic analyser for gel cards), Diagnostic Grifols, Spain สำหรับการทดสอบด้วยวิธี DG Gel

4. เครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติ (Automatic cell washer) สำหรับการทดสอบด้วยวิธี STT

วิธีการ

ทดสอบทั้งวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (STT) และวิธี DG Gel ไปพร้อมกัน โดยในการทดสอบด้วยวิธี STT ได้ใช้เครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติในขั้นตอน antiglobulin phase และอ่านผลด้วยตาเปล่า (macroscopic) ยกเว้นที่ขั้นตอน antiglobulin ถ้าให้ผลลบ จะดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ส่วนวิธี DG Gel ทดสอบโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (WADiana Compact automatic analyser) ตรวจยืนยันชนิดแอนติบอดีที่พบ ด้วยการทำ red cell typing ด้วย antiserum ชนิดเดียวกับแอนติบอดีที่ตรวจพบ ซึ่งได้ผลเป็นลบทุกราย ดังรายละเอียด

1. การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening)

1.1 Saline multiphase antiglobulin standard tube test¹ (STT)

1.2 DG Gel test (DG Gel)

1.2.1 Neutral gel ใช้ 1% screening cell O1 และ O2 ที่ suspended ใน DG Gel LISS solution 50 μ L โดยแยกเป็น 2 column และซีรัม 25 μ L ใน DG Gel Neutral card incubate ที่ อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

1.2.2 Coombs gel ใช้ 1% screening cell O1 และ O2 ที่ suspended ใน DG Gel LISS solution 50 μ L โดยแยกเป็น 2 column และซีรัม 25 μ L ใน DG Gel Coombs card incubate ที่ 37°C นาน 15 นาที ปั่นอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

2. การตรวจหาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification)

นำซีรัมที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดีทั้ง 2 วิธี มาตรวจหาชนิดของแอนติบอดีโดยใช้ panel cells หากผลการตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกทั้งสองวิธี จะตรวจหาแอนติบอดีด้วย STT โดยใช้ ซีรัม 2 หยด ทำปฏิกิริยากับ 3% Panel cells 1 หยด แต่ถ้าผลการตรวจกรองแอนติบอดีให้ผลบวกเฉพาะวิธีเจล จะตรวจหาแอนติบอดี ด้วยวิธีเจล

3. ตรวจยืนยันความถูกต้องของชนิดแอนติบอดี โดยการหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยรายนั้น (red cell typing) ด้วย known antiserum ระบบเดียวกับแอนติบอดีที่ตรวจพบ โดยมี positive และ negative red cell control ทดสอบควบคู่ไปด้วย

4. สถิติ ใช้สถิติเชิงพรรณนา คำนวณความซุก (prevalence) ของการตรวจพบแอนติบอดีและชนิดแอนติบอดีในผู้ป่วย เป็นร้อยละ

และวิเคราะห์ค่าพหุคูณทางสถิติด้วย Z test และ Fisher's Exact Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กำหนดค่าพหุคูณที่ $p < 0.05$

การศึกษานี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICH GCP) ให้ไว้ ณ วันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ลำดับที่ 3.4.02: 48/2555 เลขที่ : HE552269

ผลการศึกษา

ตัวอย่างในการศึกษานี้ได้จากซีรัมของผู้ป่วยไม่ซ้ำตัวบุคคล มีประวัติรับโลหิตครั้งที่ 2 ขึ้นไป และมีระยะเวลาห่างจากการรับเลือดครั้งก่อนหน้า ไม่น้อยกว่า 21 วัน จำนวน 750 ราย อายุระหว่าง 1-93 ปี ค่าเฉลี่ยอายุ 46.24 ± 23.10 ประกอบด้วยเพศหญิง 361 ราย (48.13%) และเพศชาย 389 ราย (51.87%) ตรวจพบความชุกของแอนติบอดีระหว่างเพศชายและเพศหญิง ร้อยละ 6.68 และ 9.97 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

Table 1 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วย ระหว่างวิธี STT และ DG Gel พบแอนติบอดีด้วยวิธี STT 61 ราย ใน 750 ราย (8.13%) วิธี DG Gel 55 ราย ใน 750 ราย (7.33%) วิธี STT และ DG Gel (Coombs & Neutral) ให้ผลบวกสอดคล้องกัน 54 ราย และให้ผลลบสอดคล้องกัน 688 ราย ให้ผลบวกเฉพาะ STT 7 ราย และให้ผลบวกเฉพาะวิธี DG Gel 1 ราย รวมตรวจพบแอนติบอดีทั้งหมด 62 ราย วิธี STT ตรวจพบแอนติบอดีได้มากกว่าวิธี DG Gel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

วิธี DG Gel มีค่า sensitivity, specificity, false positive, false negative, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) และ efficiency เป็น 98.2%, 99.0%, 1.8%, 1.0%, 98.2%, 99.0% และ 98.9% ตามลำดับ

Table 2 แสดงการตรวจยืนยันชนิดของแอนติบอดีจำนวน 62 ราย ที่พบในผู้ป่วย ด้วย วิธี STT และ DG Gel (Coombs & Neutral) ที่ให้ผลบวกสอดคล้องกัน 54 ราย ได้แก่ anti-Mi^a, anti-E, anti-P₁, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-Le^a+Le^b, anti-Jk^a, anti-c, anti-E+anti-Mi^a, anti-E+anti-c, anti-Le^b+anti-Mi^a,

anti-E+anti-Fy^b, anti-Le^a+anti-P₁ และ anti-Le^a+Le^b+anti-P₁ จำนวน 28 (45.90%), 6 (9.84%), 4 (14.75%), 3 (8.19%), 1 (1.64%), 1 (1.64%), 2 (3.28%), 1 (1.64%), 2 (3.28%), 2 (3.28%), 1 (1.64%), 1 (1.64%), 1 (1.64%) และ 1 (1.64%) ราย ตามลำดับ แอนติบอดีที่ตรวจพบด้วยวิธี STT อย่างเดียว 7 ราย ได้แก่ anti-P₁ จำนวน 5 ราย และ anti-Le^a จำนวน 2 ราย ส่วนแอนติบอดีที่ให้ผลลบต่อ STT แต่ให้ผลบวกกับ DG Gel 1 ราย พบเป็น unidentified antibody

Table 3 แสดงชนิดและความถี่ของแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วยรับเลือด 61 ราย จำแนกเป็นแอนติบอดีทั้งหมด 7 ชนิด โดยพบ anti-Mi^a มากที่สุด 31 ราย (50.82%), anti-P₁ 11 ราย (18.03%), Lewis antibodies 10 ราย (16.39%), anti-E 11 ราย (18.03%), anti-c 3 ราย (4.92%), anti-Jk^a 2 ราย (3.28%) และ anti-Fy^b 1 ราย (1.64%)

Table 4 แสดงปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่ตรวจพบเฉพาะ STT อย่างเดียว แยกตามการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้นตอนต่างๆ ประกอบด้วย anti-P₁ 5 ราย รายที่ 1 ทำปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอน ให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาเป็น 3+, 2+ และ 1+ ตามลำดับ รายที่ 2, 3, 4 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและที่ 37°C ให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาเป็น 1+ ทั้งสองขั้นตอน และรายที่ 5 ทำปฏิกิริยาเฉพาะที่อุณหภูมิห้อง มีความแรงของปฏิกิริยาเป็น 1+ ส่วน anti-Le^a จำนวน 2 ราย พบว่า รายที่ 1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและที่ 37°C ให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาเป็น 1+ ทั้งสองขั้นตอน และ anti-Le^a รายที่ 2 ทำปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอน ให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 37°C และ AHG เป็น 1+, 1+ และ weakly positive (+w) ตามลำดับ ซึ่งปฏิกิริยาทั้งหมดเป็นปฏิกิริยาที่ได้จากการอ่านผลด้วยตาเปล่า โดยทุกรายให้ผลบวกที่อุณหภูมิห้อง

วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษานี้ได้ตรวจหาแอนติบอดีทั้งสองวิธี โดยทดสอบไปพร้อมๆ กัน พบว่าวิธี STT และวิธี DG Gel (Diagnostic Grifols gel: Coombs & Neutral) ให้ผลบวกสอดคล้องกัน 54 ราย และให้ผลลบสอดคล้องกัน 688 ราย ให้ผลบวกเฉพาะ STT 7 ราย และให้ผลบวกเฉพาะวิธี DG Gel 1 ราย ซึ่งไม่สามารถจะบอกได้ว่าเป็น specific antibody หรือไม่ รวมตรวจพบแอนติบอดี

Table 1 Comparison of alloantibodies detected in transfused patients by STT and DG Gel

	STT	Positive (cases)	Negative (cases)	Total (cases)	p-value*
DG Gel					
Positive		54	1**	55 (7.33%)	<0.001
Negative		7	688	695	
Total		61 (8.13%)	689	750	

*Fisher's Exact Test (Some cells have expected count less than 5); ** Unidentified antibody

Table 2 Antibody specificities detected by STT and DG Gel

Specificity	STT+ Gel+	STT+ Gel-	STT- Gel+	Total (cases)	%
Single antibody					
Anti-Mi ^a	28	0	0	28	45.90
Anti-E	6	0	0	6	9.84
Anti-P ₁	4	5	0	9	14.75
Anti-Le ^a	3	2	0	5	8.19
Anti-Le ^b	1	0	0	1	1.64
Anti-Le ^a +Le ^b	1	0	0	1	1.64
Anti-Jk ^a	2	0	0	2	3.28
Anti-c	1	0	0	1	1.64
Multiple antibodies					
Anti-E+anti-Mi ^a	2	0	0	2	3.28
Anti-E+anti-c	2	0	0	2	3.28
Anti-Le ^b +anti-Mi ^a	1	0	0	1	1.64
Anti-E+anti-Fy ^b	1	0	0	1	1.64
Anti-Le ^a +anti-P ₁	1	0	0	1	1.64
Anti-P ₁ +anti-Le ^a +Le ^b	1	0	0	1	1.64
Unidentified	0	0	1	1	1.64
Total (cases)	54	7	1	62	100

Table 3 Classification of single and multiple antibodies developed in 61 transfused patients

Antibody specificities	Single	Multiple	Total	
	antibody	antibodies	No.	%
Anti-Mi ^a	28	3	31	50.82
Anti-P ₁	9	2	11	18.03
Lewis antibodies (anti-Le ^a , anti-Le ^b , anti-Le ^a +Le ^b)	7	3	10	16.39
Anti-E	6	5	11	18.03
Anti-c	1	2	3	4.92
Anti-Jk ^a	2	0	2	3.28
Anti-Fy ^b	0	1	1	1.64
Total (cases)	53	8		

Table 4 Thermal amplitude characteristic of 7 antibodies detected by STT only

Alloantibodies	Total	RT only	RT + 37°C	RT + 37°C + AHG
Anti-P ₁	5	1 ^a	3 ^b	1 ^c
Anti-Le ^a	2	0	1 ^b	1 ^d
Total (cases)	7	1	4	2

a = RT 1+; b = RT 1+, 37°C 1+; c = RT 3+, 37°C 2+, AHG 1+; d = RT 1+, 37°C 1+, AHG w+

ทั้งหมด 62 ราย วิธี DG Gel มีค่า sensitivity, specificity, false positive, false negative, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) และ efficiency เป็น 98.2%, 99.0%, 1.8%, 1.0%, 98.2%, 99.0% และ 98.9% ตามลำดับ วิธี STT มีความไวสูงกว่าวิธี DG Gel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

ผลการศึกษาระยะเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี STT และวิธี DG Gel นี้ใกล้เคียงกับการศึกษาในปี 2544 ศิริธนา พงศ์ถิ่นทองงาม² เปรียบเทียบการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีระหว่างวิธีเจล (ID - Card, DiaMed AG) และวิธี STT พบว่าทั้งสองวิธีได้ผลสอดคล้องกัน 27 ใน 34 ราย (79.4%) มีตัวอย่าง 6 ราย ที่ตรวจพบด้วย STT อย่างเดียว ได้แก่ anti-P₁ 1 ราย, anti-Le^a 1 ราย และ anti-Le^a+Le^b 4 ราย ใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้พบ anti-P₁ 5 ราย และ anti-Le^a 2 ราย Eduardo Delaflor-Weiss และคณะ³ ได้นำวิธีเจล (ID - Microtyping system, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ) มาใช้ตรวจกรองแอนติบอดีและหาชนิดแอนติบอดีในโรงพยาบาลชุมชน โดยเปรียบเทียบกับวิธี STT พบว่าวิธีเจลมีความไวสูงกว่า แต่มีความจำเพาะต่ำกว่าวิธี STT แอนติบอดีบางระบบตรวจไม่พบด้วยวิธีเจล แต่ตรวจพบด้วยวิธี STT เช่น anti-D, anti-E และ anti-c แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าวิธี STT มีความไวสูงกว่าวิธี DG Gel (Diagnostic Grifols gel)

กฤษณา เอื้อน้อมจิตต์กุล⁴ เปรียบเทียบการใช้วิธีโพลีบรินวิธีเจล (ID - Card, DiaMed AG), CAT ที่ใช้ glass bead เป็นตัวกลาง (Autovue[®] innova) และ STT ในการตรวจกรองแอนติบอดีพบว่าความไวของ STT มีค่าสูงกว่าวิธีอื่น ทั้งในแอนติบอดีกลุ่มที่มีความสำคัญทางคลินิกและกลุ่มที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิก

เทคนิคหลอดทดลองมาตรฐานแอนติโกลบูลิน (Multiple phase antiglobulin standard tube test)¹ เป็นวิธีมาตรฐานที่ทำได้ง่ายใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ และราคาไม่แพง อ่านผลได้ทั้ง 3 ขั้นตอนในหลอดทดลองเดียว และสามารถดูผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ในกรณีที่ทำอ่านผลด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจน แต่ต้องใช้เทคนิคการปั่นและเขย่าก่อนอ่านผล ซึ่งขึ้นอยู่กับตัวบุคคลและมีขั้นตอนยุ่งยากในการล้างเซลล์เพื่อขจัด free antibody ออกให้หมด โดยไม่ให้อันติบอดีที่ทำปฏิกิริยากะที่ผิวเซลล์หลุดออกไปด้วย แต่ปัจจุบันมีเครื่องปั่นล้างเซลล์อัตโนมัติ (automatic cell washer) ช่วยลดข้อผิดพลาดและแรงงาน ตลอดจนเวลาในการทดสอบจากขั้นตอนการปั่นล้างได้ ในขณะที่วิธีเจล (CAT) ไม่ต้องล้างเซลล์ อ่านผลที่ end-point ของปฏิกิริยา โดยไม่ต้องเขย่า ทำให้สะดวกในการอ่านผล ใช้ปริมาณซีรัมน้อย แต่ต้องใช้ incubator และ centrifuge เฉพาะของ gel card อีกทั้งราคาแพงกว่าวิธี STT

โดยปกติ เนื่องจากการใช้เทคนิคเจลในการตรวจ หากต้องการตรวจหา IgM antibody และ IgG antibody ต้องเพิ่มเจลอีก 2 column เป็น saline gel (ไม่มีน้ำยา AHG) ซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นอีกเท่าตัว เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณ ทั้งผู้ขายและผู้ใช้ จึงนิยมใช้ Coombs gel ในการตรวจหา IgG antibody ที่มีความสำคัญทางคลินิกมากกว่า IgM antibody แต่ในการศึกษาที่ต้องการที่จะเปรียบเทียบการตรวจพบแอนติบอดีด้วยวิธีเจล ให้สอดคล้องกับขั้นตอนการตรวจด้วยวิธี STT ซึ่งตรวจหา IgM antibody ที่อุณหภูมิห้อง และการตรวจหาแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาที่ 37°C และ AHG จึงได้เพิ่มการตรวจด้วย Neutral gel (saline gel)

การศึกษานี้พบความชุกของแอนติบอดีในผู้ป่วยรับเลือดร้อยละ 8.27 (62 ราย ใน 750 ราย) โดยพบในเพศชาย ร้อยละ 6.68 (26 ราย ใน 389 ราย) เพศหญิงร้อยละ 9.97 (36 ราย ใน 361 ราย) ผู้ป่วยรับเลือดเพศชายมีความชุกของการตรวจพบแอนติบอดีน้อยกว่าเพศหญิง 3.29% (95%CI: -0.07 ถึง 0.01) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ความถี่และชนิดของ alloantibodies ที่พบมีความแตกต่างกันตามกลุ่มประชากร สิ่งแวดล้อม ตลอดจนทั้งวิธีการทดสอบและความไวของการทดสอบ โดยในการศึกษานี้พบความชุกของ alloantibodies สูงกว่าการศึกษาของผู้อื่นๆ เช่น Natukunda B และคณะ⁵ พบความชุกของ alloantibodies ในผู้ป่วยรับเลือดชาว Ugandans เท่ากับ 6.1% สูงกว่าการศึกษาของปราณี พิสัยพงศ์ และคณะ⁶ ที่ศึกษาชนิดและความถี่ของแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยภาคเหนือจำนวน 42,615 ราย โดยใช้ STT พบ unexpected antibodies จำนวน 1,207 ราย (2.83%) และ Al-Joudi F และคณะ⁷ ได้ศึกษาความชุกและชนิดของ alloantibodies ในผู้ป่วยชาวมาเลเซียที่ได้รับเลือดที่โรงพยาบาล Raja Perempuan Zainab II รั้วกลิ่นตัน พบ alloantibodies ในผู้ป่วย 65 ราย (1.13%) การศึกษานี้พบความชุกของ alloantibodies ต่ำกว่าการศึกษาของ Bilwan F และคณะ⁸ และ Wang LY และคณะ⁹ ที่พบแอนติบอดี 9.2% และ 37% ตามลำดับ ในกลุ่มผู้ป่วยชาลส์ซีเมีย ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของประชากรที่ศึกษา ระยะเวลาที่ศึกษา รวมทั้งความถี่ของการรับเลือด ทั้งนี้กลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยชาลส์ซีเมียของโรงพยาบาลขอนแก่นในการศึกษานี้ มี จำนวน 125 ราย และผู้ป่วยรับเลือดอื่น 625 ราย พบแอนติบอดีในผู้ป่วยชาลส์ซีเมีย เพียง 3 ราย (2.4%) ต่ำกว่าผู้ป่วยโรคอื่นๆ ซึ่งพบ 58 ราย (9.28%) ทั้งนี้เพราะผู้ป่วยชาลส์ซีเมียได้รับเลือดแบบ phenotype matching (E และ c) ตั้งแต่ปี พ.ศ 2551

แอนติบอดีที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้คือ anti-Mi^a ร้อยละ 50.82 ใกล้เคียงกับการศึกษาของ ปราณี พิสัยพงศ์ และคณะ⁶ ที่พบ anti-Mi^a ร้อยละ 36.76 ในภาคเหนือ และสอดคล้องกับการกระจายของหมู่เลือดต่างๆในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ¹⁰

ที่พบ Mi^a antigen ร้อยละ 13.92 ในขณะที่ Caucasians มี Mi^a antigen เพียง ร้อยละ 0.14¹¹ anti- Mi^a ทำให้เกิด immediate และ delayed HTR และ severe HDFN¹² ได้ การให้เลือดจึงต้องให้เลือด antigen-negative ที่เข้ากันได้¹²

แอนติบอดีที่ตรวจพบเฉพาะวิธี STT 7 ราย เป็น anti- P_1 5 ราย และ anti- Le^a 2 ราย ซึ่งแอนติบอดีทั้งหมดสามารถตรวจพบได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า มี anti- P_1 4 ราย และ anti- Le^a 2 ราย ที่เกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่ 37°C และ AHG ซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาแทรกซ้อนในผู้ป่วยรับเลือดได้

Anti- P_1 ที่ตรวจพบเฉพาะวิธี STT จำนวน 5 ราย มี 1 ราย ทำปฏิกิริยาทั้งสามขั้นตอน 3 ราย ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและ 37°C และอีก 1 ราย ทำปฏิกิริยาเฉพาะที่อุณหภูมิห้อง แม้ว่าแอนติบอดีกลุ่มนี้จะเป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย (minor clinical significant) แต่สามารถจับ complement ได้ ถ้าทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C ในหลอดทดลอง อาจเป็นสาเหตุการเกิด transfusion complication ในร่างกายได้ ดังที่ได้มีรายงานการเกิด acute hemolytic transfusion reaction (AHTR) โดย Arndt PA et al.¹³ ซึ่งมีสาเหตุจาก anti- P_1 ที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C และ Chandeysson PL et al.¹⁴ รายงานการเกิด delayed hemolytic transfusion reaction (DHTR) จาก anti- P_1 ซึ่งทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22-37°C ในหญิงผิวขาว หลังจากรับเลือด 2 วัน

Anti- Le^a ที่ตรวจพบเฉพาะวิธี STT จำนวน 2 ราย รายที่ 1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและ 37°C และอีก 1 ราย ทำปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอน ทั้งนี้มีรายงานการเกิด severe hemolytic transfusion reaction จาก anti- Le^a ในผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเป็น $Le(a-b-)$ ได้รับเลือดที่มีแอนติเจน $Le(a+b-)$ โดย Matson GA et และคณะ¹⁵ และ Hunter DT¹⁶ รายงานการเกิด hemolytic transfusion reaction จาก anti- Le^a ในหญิงผิวขาว หลังจากรับเลือด 14 วัน

การศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า DG Gel ไม่สามารถตรวจพบ anti- P_1 และ anti- Le^a บางรายได้ แอนติบอดีเหล่านี้พบได้ในคนไทย ที่มีความถี่ของแอนติเจนแตกต่างจากชาวตะวันตก ซึ่งความชุกของหมู่เลือดระบบ P ในคนไทยอีสาน¹⁰ มีหมู่เลือด P_1 (P_1+P antigen) ร้อยละ 22.65 หมู่เลือด P_2 (P antigen/ P_1 negative) ร้อยละ 77.35 ในขณะที่ Caucasians มี หมู่เลือด P_1 ร้อยละ 79 หมู่เลือด P_2 ร้อยละ 21¹⁷ และประชากรไทยกรุงเทพฯ มี Lewis negative ร้อยละ 30.87 ในขณะที่ Caucasians มีเพียง ร้อยละ 6^{17,18} โอกาสการสร้าง anti- P_1 และ Lewis antibodies ในคนไทย ซึ่งมี P_1 negative และ Lewis negative สูง จึงพบได้สูงกว่าชนผิวขาว

ในการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดมีความสำคัญมาก เมื่อพิจารณาถึงความไว ความจำเพาะ ตลอดจนความคุ้มค่าของค่าใช้จ่าย เทคนิคหลอดทดลองมาตรฐานยัง

เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมสำหรับหน่วยงานที่มีข้อจำกัดด้านงบประมาณและมีปริมาณงานไม่สูงมาก โดยจัดหาเครื่องปั่นล้างเซลล์อัตโนมัติและฝีกอบรวมบุคลากรในการทดสอบและอ่านผลด้วยเทคนิคที่ถูกต้อง จะช่วยให้เพิ่มความคุ้มค่าคุ้มทุน

ผลการศึกษานี้ เป็นประโยชน์ในการเพิ่มความระมัดระวังในการเตรียมเลือด ทดสอบความเข้ากันได้ของเลือดโดยวิธี DG Gel และการหาเลือดที่ไม่มีแอนติเจนจำเพาะกับแอนติบอดีของผู้ป่วย แทนการสุ่มเลือกเลือดมาทดสอบความเข้ากันได้

เอกสารอ้างอิง

1. Trudell KS. Detection and identification of antibodies. In : Harmening DM, ed. Modern blood banking and transfusion practices. 6th ed. Philadelphia : F.A. Davis Company 2012:216-40.
2. Pongtintongngam S. Comparison of antibody identification by gel test and conventional tube test. Vajira Med J 2001;45:231-6.
3. Delafior-Weiss E, Chizhevsky Vy. Implementation of gel testing for antibody screening and identification in a Community Hospital, a 3-year experience. Lab Med 2005;36:489-92.
4. Ueanomjitkul K. Comparison study of the manual polybrene, gel test, autovue innova and conventional tube test for antibody screening [A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science (Transfusion science) faculty of graduate studies]. Mahidol university, 2006.
5. Natukunda B, Schonewille H, Van de Watering L, Brand A. Prevalence and specificities of blood cell alloantibodies in transfused Ugandas with different diseases. Vox Sang 2010;98:167-71.
6. Pisapong P, Fongsatitkul L, Chainuan P, Kamtom N. Prevalence and specificities of red cell alloantibodies in the North-Thai population (abstract). Thai J Hematol Transf Med 2003;3:254.
7. Al-Joudi F, Ali AB, Ramli MB, Ahmed S, Ismail M. Prevalence and specificities of red cell alloantibodies among blood recipients in the Malaysian state of Kelantan. AJTS 2011;5:42-5.
8. Bilwani F, Kakepoto GN, Adil SN, Usman M, Hassan F, Khurshid M. Frequency of irregular red cell alloantibodies in patients with thalassemia major: a bicenter study. J Pak Med Assoc 2005;55:563-5.
9. Wang LY, Liang DC, Liu HC, et al. Alloimmunization among patients with transfusion dependent thalassemia in Taiwan. Transf Med 2006;16:200-3.
10. Keokhamphoul C, Urwijitaroon Y, Kongphaly D, Thammavong T. Blood group antigen distribution in Lao blood donors. Immunohematology 2012;28:132-6.
11. Mohn JE, Lambert RM, Rosamilia HG. Incidence of the blood group antigen Mi^a in the Caucasian and Negro population of Western New York. Transfusion 1961;1:392-3.
12. Bejrachandra S. Clinically significant of blood group antibody. Thai J Hematol Transf Med 2005;4:211-5.

13. Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, Zeger GD. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-P₁ that reacted at 37 °C. *Transfusion* 1998;38:373-7.
14. Chandeysson PL, Flye MW, Simpkins SM, Holland PV. Delayed hemolytic transfusion reaction caused by anti-P₁ antibody (abstract). *Transfusion* 1981;21:77-82.
15. Matson GA, Coe John C, Swanson J. Hemolytic transfusion reaction due to anti-Le^a. *Blood* 1955;10:1236-40.
16. Hunter DT. Hemolytic transfusion reaction and therapy: case report of reaction due to anti-Le^a. *Southern Med J* 1960;53:1283-6.
17. Leger RM. Blood Group Terminology and the Other Blood Groups. In : Harmening DM, ed. *Modern blood banking and transfusion practices*. 6th ed. Philadelphia : F.A. Davis Company, 2012:172-215.
18. Smart E, Armstrong B. Blood group systems. *ISBT Science Series. Vox Sang* 2008;3:68-92.

Red Cell Alloantibodies in Transfused Patients Detected by Standard Tube Test and Column Gel Agglutination: A Study for Improving Transfusion Service

Kanya Daowsee¹ and Yupa Urwijitaroon²

¹Blood Bank Centre, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen; ²The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

Abstract: The column agglutination technology (CAT) for red cell serology testing has been implemented world wide. The aim of this study was to reveal the prevalence of unexpected antibodies in the transfused patients and compared sensitivity and specificity of the DG Gel (Diagnostic Grifols) with the standard tube test (STT) for routine screening test. A total of 750 serum samples from transfused patients individually were screened for red cell antibodies. Red cell alloantibodies were detected in 61 out of the total of 750 (8.13%) by STT and 55 out of 750 (7.33%) by DG Gel. The concordant positive results were found in 54 out of 62 positive samples including 28 anti-Mi^a, 6 anti-E, 4 anti-P₁, 3 anti-Le^a, 1 anti-Le^b, 1 anti-Le^a+Le^b, 2 anti-Jk^a, 1 anti-c, 2 anti-E+anti-Mi^a, 2 anti-E+anti-c, 1 anti-Le^b+anti-Mi^a, 1 anti-E+anti-Fy^b, 1 anti-Le^a+anti-P₁ and 1 anti-Le^a+Le^b+anti-P₁. The discordant positive results with STT only were found in 7 out of 62 samples. DG Gel failed to detect all 5 anti-P₁ and 2 anti-Le^a. One positive sample by DG Gel only was not able to define specificity. Regarding specificity of antibodies, there were seven different antibodies identified in 61 patients including 31 anti-Mi^a (50.82%), 11 anti-P₁ (18.03%), 10 Lewis antibodies (16.39%), 11 anti-E (18.03%), 3 anti-c (4.92%), 2 anti-Jk^a (3.28%) and 1 anti-Fy^b (1.64%). DG Gel showed sensitivity, specificity, false positive, false negative, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and efficiency 98.2%, 99.0%, 1.8%, 1.0%, 98.2%, 99.0% and 98.9%, respectively. The results of this study indicated that STT had higher sensitivity than that of DG Gel ($p < 0.001$). DG Gel had limitation in detection of anti-P₁ and Lewis antibodies which are commonly found in the Thai population with high prevalence of negative P₁ at 77%, and Lewis negative at 30%. Although they are considered as less clinically significant antibodies when reacting at 37°C, transfusion complication could be occurred.

Key Words : ● Red cell alloantibodies ● Transfused patient ● Antibody screening ● Standard tube test
● Gel test

J Hematol Transfus Med 2013;23:269-76.

