

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาความแรงของ ABO antibodies ด้วยวิธี หลอดทดลองมาตรฐาน และเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี column agglutination technique

สุนิสา อ้นบันส์¹ จุฑาลักษณ์ ใจเพียร¹ ญัฐรุรัตน์ หล่ออุเจริญ¹ และ ฤดา จองพิศาล²
¹ฝ่ายธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ²ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

บทนำ การตรวจหาความแรงของแอนติบอดีหมู่เลือด ABO มีความสำคัญต่อกระบวนการวางแผนรักษาผู้ป่วยปลูกถ่ายอวัยวะที่มีหมู่เลือด ABO เข้ากันไม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือด ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำวิธีการตรวจโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยวิธี column agglutination ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่มีความแน่นอน และ แม่นยำ มาแทนที่วิธีหลอดทดลองมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าความแรงของแอนติบอดีหมู่เลือด ABO ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยวิธี column agglutination **วัสดุและวิธีการ** ตัวอย่างพลาสมาของผู้บริจาคโลหิต จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยจำนวน 180 ราย ประกอบด้วยหมู่โลหิต A, B และ O อย่างละ 60 ราย นำมาทดสอบหาค่าความแรงของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยวิธี column agglutination และนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างสองวิธี **ผลการศึกษา** พบว่าในจำนวนตัวอย่างทั้งหมดค่าความแรง ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและด้วยวิธี column agglutination มีความสอดคล้องร้อยละ 81.67-98.30 และมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในระดับสูงเท่ากับ 0.73-0.94 และมีความสอดคล้องโดย Bland-Altman plot พบว่า ค่าเฉลี่ยความแตกต่างอยู่ระหว่าง -0.39 ถึง 0.53 **สรุป** การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผลการตรวจความแรงของแอนติบอดีหมู่เลือด ABO โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วยวิธี column agglutination และด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน มีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมากและมีความสอดคล้องกันดี แสดงถึงความน่าเชื่อถือของผลการตรวจ สามารถนำมาใช้ในงานประจำได้

คำสำคัญ : ● ความแรงของแอนติบอดีหมู่เลือดเอบีโอ ● วิธีคอลัมน์ แอ็กกลูตินชัน

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2563;30:137-46.

ได้รับต้นฉบับ 25 มีนาคม 2563 แก้ไขบทความ 24 เมษายน 2563 รับลงตีพิมพ์ 12 พฤษภาคม 2563

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสุนิสา อ้นบันส์ ฝ่ายธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

E-mail : suni_ons@hotmail.com

Original article

Comparative study of ABO antibody titers using conventional tube technique and automated column agglutination techniqueSunisa Onpuns¹, Jutaluk Jaipian¹, Nattarat Lorucharoen¹ and Yuda Chongpison²¹Transfusion Medicine Unit, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society; ²Research Affair, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University**Abstract:**

Background: ABO antibody titration is an integral part for management of ABO incompatible organ transplantation, especially ABO-incompatible kidney transplants. Due to the precision of an automation, we planned to apply a fully automated antibody titration method using the column agglutination technique (auto-CAT) instead of a conventional tube technique (CTT). **Objective:** To compare and correlate ABO antibody titers using CTT and auto-CAT. **Materials and Methods:** A total of 180 donor serum samples consisted of 60 samples for each A, B and O blood groups, antibody titrations were performed using CTT and auto-CAT simultaneously. Spearman's correlation and Bland-Altman plot were used to determine the correlation of ABO antibody titers between the two methods and to compare the methods agreement, respectively. **Results:** In all samples, the concordance rate of CTT and auto-CAT for IgM and IgG ABO antibody titers were 81.67% to 98.30% and correlated well with spearman rho correlation coefficient of 0.73-0.94 ($p < 0.001$). The Bland-Altman plot showed that the mean differences between the two methods were -0.39 to 0.53. **Conclusion:** This study demonstrated that ABO antibody titers measured by auto-CAT and CTT had a highly significant correlation, and good agreement indicated reliable results. Thus auto-CAT can be implemented to perform antibody titration in routine laboratory testing.

Keywords : ● Titer of ABO antibodies ● Column agglutination technique

J Hematol Transfus Med. 2020;30:137-46.

บทนำ

แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบ ABO มีคุณสมบัติเป็นทั้ง IgM, IgG และอาจพบ Ig A ในปริมาณเล็กน้อย anti-A และ anti-B ที่พบในหมู่เลือด B และ A ส่วนใหญ่เป็น IgM อาจมี IgG ปนบ้าง แต่ในหมู่เลือด O ส่วนใหญ่ จะเป็นชนิด IgG แอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ IgG ของหมู่เลือดระบบ ABO มีคุณสมบัติทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 20-24°C หรือต่ำกว่า และทำปฏิกิริยาได้จนถึงอุณหภูมิ 37°C รวมทั้งสามารถ fix complement ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ แอนติเจนของระบบ ABO นอกจากพบบนเม็ดเลือดแดงแล้ว ยังพบบนเม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อ epithelial cells และ endothelial cells ของหลอดเลือดและอวัยวะต่างๆ เช่น ไต ตับ หัวใจ รวมทั้งพบในสารคัดหลั่ง แอนติบอดีในระบบ ABO จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด acute hemolytic transfusion reaction, hemolytic disease of the fetus and newborn, ภาวะ hemolysis ใน ABO incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation ชนิด major mismatch และทำให้เกิดการปฏิเสธอวัยวะอย่างเฉียบพลัน (hyperacute rejection) กรณีปลูกถ่ายอวัยวะแบบ ABO incompatible ในการปลูกถ่ายตับ หัวใจ และไต เป็นต้น¹⁻⁴

ในอดีตการปลูกถ่ายไตในหมู่โลหิตที่เข้ากันไม่ได้เป็นข้อห้ามอย่างเด็ดขาดของการปลูกถ่าย แต่ในปัจจุบันสามารถปลูกถ่ายไตแบบข้ามหมู่เลือดได้ เนื่องจากมี organ shortage โดยการเตรียมผู้ป่วยก่อนการผ่าตัดด้วยการทำ desensitization เพื่อลดระดับความแรง (titer) ของ anti-A/anti-B ให้เหลือน้อยในระดับที่เหมาะสม จึงสามารถทำการปลูกถ่ายได้อย่างปลอดภัย และภายหลังการปลูกถ่ายมีการเฝ้าติดตามค่าไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ให้อยู่ในระดับต่ำอย่างต่อเนื่อง เพราะค่าไตเตอร์ที่สูงขึ้นเป็นตัวชี้วัดหนึ่งของภาวะการเกิดการปฏิเสธการปลูกถ่ายด้วยสาเหตุจากแอนติบอดี (antibody-mediated rejection: AMR)⁵⁻⁷ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ได้ทำการปลูกถ่ายไตข้ามหมู่เลือดเป็นครั้งแรกของประเทศไทย เมื่อ พ.ศ 2551⁸ และมีจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอย่างต่อเนื่องเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยระดับไตเตอร์เป้าหมายของ anti-A/anti-B ที่ใช้พิจารณาการปลูกถ่ายคือค่าต่ำกว่าหรือเท่ากับ 16⁹ ดังนั้นวิธีการตรวจหาไตเตอร์ของ anti-A/anti-B จึงควรเป็นวิธีที่ให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ และคงที่ เพราะระดับไตเตอร์เป็นกุญแจสำคัญของการตัดสินใจว่าจะผ่าตัดให้กับผู้ป่วยหรือไม่ และเป็นค่าหนึ่งที่จะช่วยประเมินการสูญเสียไตหลังได้รับการปลูกถ่ายในผู้ป่วยเช่น ในกรณีค่าไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ในผู้ป่วยสูงกว่าเกณฑ์ แต่มีการรายงานค่าไตเตอร์ของ anti-A/anti-B น้อยกว่าค่าจริงของผู้ป่วยทำให้ผู้ป่วยได้รับการปลูกถ่ายไต

ทำให้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิด AMR และการสูญเสียไต นอกจากนี้การตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการรักษาอื่นๆ เช่น การให้เกล็ดเลือดต่างหมู่ การปลูกถ่ายไขกระดูก และการปลูกถ่ายตับ และหัวใจ เป็นต้น¹⁰⁻¹³

ธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตรวจหาระดับไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (conventional tube technique: CTT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีข้อดีคือทำได้ง่าย ราคาถูก สามารถตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ได้ในการทดสอบครั้งเดียว แต่มีข้อด้อยคือ มีขั้นตอนในการทดสอบมาก และเป็น manual ทั้งหมด จึงใช้เวลานานในการรายงานผลการทดสอบ และมีหลายขั้นตอนที่มีโอกาสทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดคลาดเคลื่อนได้ เช่น ขั้นตอนการเจือจางพลาสมา ขั้นตอนการล้างเซลล์ โดยเฉพาะขั้นตอนการอ่านผล ต้องเขย่าหลอดทดลองซึ่งไม่สามารถกำหนดมาตรฐานความแรงของการเขย่าได้ (subjective) ผลการตรวจจึงมีความแตกต่างตามประสบการณ์และความชำนาญของเจ้าหน้าที่แต่ละคน วิธี CTT จึงเป็นวิธีที่ยากต่อการควบคุมและติดตามค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นมาตรฐานเดียวกัน^{7,14-16}

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี column agglutination technique (CAT) ให้สามารถตรวจวิเคราะห์หาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีได้ โดยเครื่องมีการทำงานแบบ fully automate ตั้งแต่ นำตัวอย่างทดสอบเข้าเครื่อง เครื่องจะนำพลาสมาไปเจือจาง และทำการทดสอบให้ทั้งหมด รวมทั้งอ่านผล แปลผล และบันทึกผลการทดสอบ ระบบถูกควบคุมโดยคอมพิวเตอร์ จึงช่วยลดข้อผิดพลาดจากการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ และทำให้ได้ผลการตรวจที่มีความแน่นอน และมีความแม่นยำสูง (objective & reproducibility) เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติยังมีข้อดีคือ การใช้งานง่ายสะดวก ให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว แต่มีข้อเสียที่ราคาต้นทุนสูง ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ไตเตอร์ของ ABO antibodies ระหว่างวิธี CTT และวิธี CAT จำนวนมากที่สรุปแนะนำให้ใช้วิธี CAT เป็นมาตรฐานในงานตรวจหาไตเตอร์ ของ ABO antibodies¹⁷⁻²³ อย่างไรก็ตามการศึกษาเปรียบเทียบวิธี CAT ดังกล่าวเกือบทั้งหมดเป็นวิธี manual CAT (gel test) มีการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ ด้วย วิธี CAT น้อยมาก²⁰

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี CTT และเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี CAT รวมทั้งหาความสัมพันธ์และความสอดคล้องระหว่างสองวิธี ผลการวิจัยจะเป็นแนวทางในการ

พัฒนาเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี CAT มาใช้ในงานประจำสำหรับการทดสอบ antibody titration ของฝ่ายธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ แทนวิธี CTT เดิม และเพื่อเป็นแนวทางให้แพทย์นำไปใช้พิจารณาปรับเปลี่ยนระดับไตเตอร์ของ ABO antibodies เป้าหมายก่อนและหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายไต

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างตรวจ เป็นตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิต (EDTA blood) จากฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2562 ตัวอย่างเลือดมีผลการตรวจหมู่โลหิต ABO ปกติ และไม่มี red cell alloantibodies ในพลาสมาจำนวน 180 ราย ประกอบด้วยหมู่โลหิต A, B และ O อย่างละ 60 ราย นำมาปั่นแยกพลาสมา เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C และแบ่งมาทดสอบหาค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ด้วยวิธี CTT และโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี CAT ในวันและเวลาเดียวกัน

2. เซลล์และน้ำยาทดสอบ

2.1 3% A1 cells/ B cells และน้ำยา antihuman globulin (AHG) ผลิตภัณฑ์ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สำหรับวิธี CTT

2.2 0.8% Affirmagen (A1, B), reverse diluent cassette และ Anti-IgG, -C3d; polyspecific cassette ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics (United Kingdom) สำหรับวิธี CAT

3. เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ

3.1 เครื่องปั่นอ่านปฏิบัติการหลอดทดลอง (serologic centrifuge) ผลิตภัณฑ์ของ Kokuson corporation, Japan

3.2 เครื่องปั่นล้างเซลล์อัตโนมัติ ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Helmer scientific, United States of America

3.3 เครื่องอุ่นปฏิบัติการหลอดทดลอง 37°C

3.4 เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer, Ortho Clinical Diagnostics, UK)

วิธีการทดสอบ

1. การตรวจหาค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (CTT)²⁴ เจือจางพลาสมาที่จะทดสอบแบบ serial two-fold dilution โดยใส่น้ำเกลือปกติปริมาตร 500 μL ในแต่ละหลอดทดลอง จำนวน 12 หลอด ใส่พลาสมา 500 μL ในหลอดแรก ผสมให้เข้ากัน แล้วดูพลาสมาที่เจือจางในหลอดแรก

500 μL ไปทำให้เจือจางต่อในหลอดถัดไป จนครบ 12 หลอด (1:2 ถึง 1:2048) ต่อจากนั้นแบ่งพลาสมาที่เจือจางแล้วหลอดละ 200 μL ลงในหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 12 หลอด (ทำเหมือนกัน 2 ชุด) เสร็จแล้วเติม 3% A cell หรือ B cell ปริมาตร 100 μL ลงในหลอดทดลองทั้งหมด เขย่าให้เข้ากัน หลอดทดลองชุดแรก (12 หลอด) incubate ที่อุณหภูมิห้อง (RT) นาน 15 นาที ครบเวลานำไปปั่นอ่านผล 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ 3,400 rpm ดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ค่าไตเตอร์ของ IgM antibodies คือส่วนกลับของ dilution หลอดสุดท้ายที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่า (weak)¹⁵ ในเวลาเดียวกันนำหลอดทดลองชุดที่สอง (12 หลอด) ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปล้าง 3 ครั้งด้วยเครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติ หยดน้ำยา AHG หลอดละ 2 หยด (วิธี indirect antiglobulin test : IAT)²⁵ ปั่นอ่านผล ค่าไตเตอร์ของ IgG antibodies คือ ส่วนกลับของ dilution หลอดสุดท้ายที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่า (weak)

2. การตรวจหาค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติวิธี CAT ในเวลาเดียวกับที่ทดสอบด้วยวิธี CTT จะแบ่งพลาสมาของตัวอย่างทดสอบรายเดียวกันไปทดสอบในเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) เครื่องจะทำการทดสอบหาค่าไตเตอร์ของ anti-A/ anti-B ทุกขั้นตอนเป็นอัตโนมัติ เริ่มตั้งแต่เจือจางพลาสมาแบบ serial two-fold dilution (1:2 ถึง 1:1024) ต่อจากนั้นจะนำพลาสมาที่เจือจางแล้วปริมาตร 40 μL ไปทดสอบกับ 0.8% Affirmagen (A1/B) ปริมาตร 50 μL ในแต่ละ microcolumn ซึ่ง 6 microcolumn จะประกอบเป็น 1 cassette กรณีทดสอบหาค่าไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ชนิด IgM เครื่องจะทดสอบบน reverse diluent cassette และปั่นอ่านผลทันทีที่เติม A1/B cell เสร็จ กรณีทดสอบหาค่าไตเตอร์ชนิด IgG เครื่องจะทดสอบบน anti-IgG,-C3d; polyspecific cassette, incubate ที่ 37°C 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นอ่านผล 5 นาที เครื่องจะอ่านผล แปลผล และแสดงให้เห็นเป็นรูปภาพค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG คือ ส่วนกลับของ dilution แรก ของ microcolumn ที่เครื่องอ่านผล 0.5+ (weak)²⁰

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการตรวจไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี CTT มาศึกษาเปรียบเทียบ (comparison) กับผลที่ได้จากวิธี CAT ด้วยสถิติเชิงอนุมาน (inference statistic) โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed rank test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างสองวิธี โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบ Spearman (Spearman correlation

coefficient) วิเคราะห์ความสอดคล้อง (agreement) ของค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ได้จากการทดสอบจากทั้งสองวิธี โดยใช้ค่า natural log ที่ transform มาจากค่าไตเตอร์ด้วยสถิติ Bland-Altman plot และ Lin's Concordance การวิเคราะห์ข้อมูลครั้งนี้ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป STATA Version 15 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: release 15. College Station, TX: StataCorp LLC.) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสโครงการที่ 16/2561

ผลการศึกษา

จากการศึกษาโดยนำพลาสมาผู้บริจาคโลหิตหมู่เลือด A, B และ O จำนวนหมู่ละ 60 ราย มาตรวจวิเคราะห์ค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ด้วยวิธี CTT และเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) ด้วยวิธี CAT พบว่า ในจำนวนตัวอย่างทดสอบทั้งหมด ค่าไตเตอร์ของ ABO antibodies ที่ตรวจได้จากทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน (concordance rate) 81.67% ถึง 98.30% (เมื่อเปรียบเทียบจากค่าไตเตอร์ที่ต่างกันไม่เกิน 1 dilution) ในจำนวนตัวอย่างดังกล่าว ค่าไตเตอร์ของ ABO antibody ชนิด IgG มีความสอดคล้องมากกว่าค่าไตเตอร์ชนิด IgM โดยพบว่าค่าไตเตอร์ของ anti-A ชนิด IgG ในหมู่เลือด O มี concordance rate สูงสุดคือ 98.30% (59 ราย) รองลงมาคือ ค่าไตเตอร์ของ anti-A ชนิด IgG ในหมู่เลือด B มี concordance rate เท่ากับ 96.67% (58 ราย) และ ค่าไตเตอร์ของ anti-B ชนิด IgM ในหมู่เลือด A มี concordance rate น้อยสุดคือ 81.67% (49 ราย) ดังรายละเอียดใน Table 1

ผลการเปรียบเทียบ (comparison) ค่า median ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ในหมู่เลือด A, B และ O ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี CTT และด้วยวิธี CAT พบว่าส่วนมากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ยกเว้นค่า median ของไตเตอร์ของ anti-A ชนิด IgM ในหมู่เลือด B และ ไตเตอร์ชนิด IgG ของ anti-A และ anti-B ในหมู่เลือด O ที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสองวิธี ดังรายละเอียดใน Table 2

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี CTT และด้วยวิธี CAT จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด พบว่ามีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกันในระดับสูง²⁶ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Spearman correlation coefficient; rho) ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG มีค่าสูงสุด (rho เท่ากับ 0.94 และ 0.90 ตามลำดับ) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgM อยู่ในระดับสูง (rho เท่ากับ 0.86 และ 0.73 ตามลำดับ) ทั้งหมดนี้มีค่า $p < 0.001$ สำหรับผลการวิเคราะห์ความสอดคล้อง (agreement) ด้วยสถิติ Lin's Concordance พบว่าค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ระหว่างสองวิธีมีความสอดคล้อง (agreement) กัน²⁷ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยพบว่าค่า Lin's Concordance correlation coefficient (CCC) ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgM มีค่าเท่ากับ 0.83 และ 0.72 ตามลำดับ และของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG มีค่าเท่ากับ 0.93 และ 0.88 ตามลำดับ ดังรายละเอียดใน Table 3

ผลการวิเคราะห์ agreement ระหว่างสองวิธี ด้วยสถิติ Bland-Altman plot โดยประเมินจากค่าเฉลี่ยความแตกต่าง

Table 1 Concordance of ABO antibody titer results by CAT and CTT

Blood group antibody (no. samples)	IgM				IgG			
	Concordance*	CAT Identical to CTT titer	CAT > CTT titer	CAT < CTT titer	Concordance*	CAT Identical to CTT titer	CAT > CTT titer	CAT < CTT titer
Anti-B in blood group A (60)	49 (81.67%)	24 (40.00%)	5 (8.33%)	31 (51.67%)	54 (90.00%)	28 (46.67%)	2 (3.33%)	30 (50.00%)
Anti-A in blood group B (60)	56 (93.30%)	30 (50.00%)	13 (21.67%)	17 (28.33%)	58 (96.67%)	27 (45.00%)	10 (16.67%)	23 (38.33%)
Anti-A in blood group O (60)	54 (90.00%)	23 (38.33%)	35 (58.33%)	2 (3.33%)	59 (98.30%)	34 (56.67%)	13 (21.67%)	13 (21.67%)
Anti-B in blood group O (60)	51 (85.00%)	20 (33.33%)	37 (61.67%)	3 (5.00%)	57 (95.00%)	26 (43.33%)	23 (38.33%)	11 (18.33%)

CTT= conventional tube test; CAT= column agglutination technique; *concordance within one dilution difference

Table 2 Median comparison of ABO antibody titers between CTT and CAT

Blood group antibodies (no. samples)	Median (min-max) of antibody titer in each method					
	CTT IgM	CAT IgM	p-value*	CTT IgG	CAT IgG	p-value*
Anti-B in blood group A (60)	64 (8-512)	32 (4-512)	< 0.001	64 (8-1024)	64 (8-512)	< 0.001
Anti-A in blood group B (60)	32 (4-256)	32 (4-128)	0.58	64 (4-256)	32 (2-128)	0.04
Anti-A in blood group O (60)	128 (8-512)	192 (16-1024)	< 0.001	256 (64-4096)	256 (64-1024)	0.56
Anti-B in blood group O (60)	128 (8-512)	128 (16-1024)	< 0.001	512 (32-2048)	512 (16-1024)	0.06

CTT= conventional tube test; CAT= column agglutination technique; *p-value from Wilcoxon signed rank test

Table 3 Correlation and agreement of ABO antibody titers between CTT and CAT among all samples

Blood group antibodies (no. samples)	Spearman correlation coefficient (rho)		Lin's Concordance correlation coefficient (CCC)*	
	IgM	IgG	IgM	IgG
Anti-A (120)	0.86 (p < 0.001)	0.94 (p < 0.001)	0.83 (p < 0.001)	0.93 (p < 0.001)
Anti-B (120)	0.73 (p < 0.001)	0.90 (p < 0.001)	0.72 (p < 0.001)	0.88 (p < 0.001)

*based on natural log-transformation of titer's values

Table 4 Agreement of ABO antibody titers between CTT and CAT using Bland-Altman plot*

Blood group antibodies (no. samples)	IgM		IgG	
	Bias (mean difference)	95% Limit of Agreement	Bias (mean difference)	95% Limit of Agreement (lower, upper)
Anti-B in blood group A (60)	-0.39	-1.70, 0.92	-0.39	-1.37, 0.59
Anti-A in blood group B (60)	-0.03	-1.25, 1.18	-0.17	-1.22, 0.88
Anti-A in blood group O (60)	0.46	-0.53, 1.45	-0.07	-1.06, 0.92
Anti-B in blood group O (60)	0.53	-0.68, 1.74	0.15	-0.97, 1.27

*based on natural log-transformation of titer's values

(mean difference) ของผลการตรวจวิเคราะห์ซึ่งใช้ค่า natural log ที่ transform มาจากค่าไตเตอร์พบว่า ค่า mean difference ระหว่างค่า log titer ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgM ในหมู่เลือด A, B และ O ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับด้วยวิธี CTT อยู่ใน ช่วง -0.39 ถึง 0.53 ค่า mean difference ระหว่างค่า log titer ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ในหมู่เลือด A, B และ O ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับด้วยวิธี CTT อยู่ใน ช่วง -0.39 ถึง 0.15 ดังรายละเอียดใน Table 4

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) มีความน่าเชื่อถือให้ผลการตรวจที่สอดคล้องและสัมพันธ์กับผลการตรวจด้วยวิธี CTT ในระดับที่สูงมาก ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบน้อยกว่าวิธี CTT โดยพบว่าเวลาเฉลี่ยในการตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies ทั้งชนิด IgM และ

IgG ในหมู่เลือด A/B 44 นาที ขณะที่การตรวจด้วยวิธี CTT ใช้เวลาเฉลี่ย 54 นาที และใช้เวลาเฉลี่ยในการตรวจหาไตเตอร์ของ anti-A/anti-B ทั้งชนิด IgM /IgG ในหมู่เลือด O โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ 62 นาที ขณะที่การตรวจด้วยวิธี CTT ใช้เวลาเฉลี่ย 75 นาที

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) ด้วยวิธี CAT ในการตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies ทั้งชนิด IgM และ IgG โดยการเปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธี CTT ที่ปัจจุบันใช้เป็นมาตรฐานในงานประจำ จากกลุ่มตัวอย่างพลาสมาผู้บริจาคโลหิต จำนวน 180 ราย ประกอบด้วยหมู่โลหิต A, B และ O อย่างละ 60 ราย ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า median ของไตเตอร์ของ ABO antibodies ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี CTT เท่ากับผลการตรวจด้วยวิธี CAT แต่เนื่องจากค่า median ของไตเตอร์ของตัวอย่างทั้งหมดมีการกระจายตัวกว้าง (variation สูง) ทำให้เมื่อนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ จึงพบ

ว่าค่า median ของไตเตอร์ของ ABO antibodies ที่ตรวจด้วยวิธี CTT และด้วยวิธี CAT มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเกือบทุกหมู่เลือด (Table 2) ยกเว้นค่า median ของไตเตอร์ของ anti-A ชนิด IgM ในหมู่เลือด B และไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ในหมู่เลือด O ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Park ES และคณะ¹⁸ ที่พบว่าค่า median ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ในหมู่เลือด B และ A ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี CTT ไม่มีความแตกต่างกับค่าที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี CAT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าค่า median ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ในหมู่เลือด O ที่ตรวจด้วยวิธี CAT สูงกว่าที่ตรวจด้วยวิธี CTT (anti-A, $p < 0.001$; anti-B, $p < 0.001$) ความแตกต่างของผลการศึกษานี้จะมีสาเหตุจากการศึกษาของ Park ES และคณะ เป็นการตรวจด้วยวิธี gel ซึ่งเป็นวิธี manual-CAT และใช้ LISS/Coombs card ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Diamed, Switzerland ซึ่งภายใน column บรรจุ gel particle เป็นตัวกลาง แต่การศึกษานี้ใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติซึ่งเป็นวิธี auto-CAT และใช้ cassette card ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics ซึ่งภายใน column มี glass beads เป็นตัวกลาง รวมทั้งเซลล์และน้ำยาที่ใช้ทดสอบ ตลอดจนวิธีการในการตรวจหาไตเตอร์ชนิด IgG ต่างกัน เป็นผลให้ได้ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีแตกต่างกัน^{16,28-30}

ตามมาตรฐานของสมาคม American Association of Blood Banks (AABB)²⁴ การตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีเป็นการวัดความเข้มข้นของแอนติบอดี โดยการเจือจางพลาสมาด้วยวิธี serial two-fold dilution เป็นวิธีกึ่งปริมาณ (semi-quantitative method) เป็นผลให้เทคนิคทดสอบมี variation ได้มาก และด้วยความผันแปรต่างๆ ของสารในพลาสมาเอง ส่งผลให้การทดสอบหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีในพลาสมาเดียวกันอาจได้ค่าไตเตอร์สูงหรือต่ำแตกต่างกันได้ 1 dilution ในแต่ละครั้งของการทดสอบ ดังนั้นในการศึกษาเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ ต้องแตกต่างกันตั้งแต่ 3 dilutions ขึ้นไป จึงถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้พบว่า concordance rate ของตัวอย่างทดสอบที่ตรวจด้วยวิธี CAT ที่มีค่าไตเตอร์ต่างกันไม่เกิน 1 dilution กับด้วยวิธี CTT สูงมากเท่ากับ 81.67-98.30% โดยพบว่า concordance rate ของไตเตอร์ชนิด IgG ในหมู่เลือด O และ B สูงที่สุด คือ 98.3% และ 96.67% ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งผลการศึกษานี้ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Shirey RS และคณะ³⁰ ที่พบว่า concordance rate ของไตเตอร์ชนิด IgG ในหมู่เลือด O ระหว่างตรวจด้วยวิธี CTT และด้วยวิธี CAT ได้เท่ากับ 100% โดยพบว่าจำนวนตัวอย่างทดสอบที่ค่าไตเตอร์เท่ากับ ค่า concor-

dance rate เท่ากับ 86% อีก 14% คือค่า concordance rate ของจำนวนตัวอย่างทดสอบที่ค่าไตเตอร์ต่างกันไม่เกิน 1 dilution ความคล้ายกันของผลการศึกษานี้จะเป็นเพราะวัสดุและวิธีการที่ใช้ตรวจไตเตอร์ชนิด IgG คล้ายกัน ได้แก่พลาสมาที่ใช้ทดสอบในขั้นตอนทำ IAT ของวิธี CTT จะแยกชุดกับชุดตรวจค่า IgM โดยเริ่มจาก incubate ที่ 37°C ไม่ผ่านเฟส RT รวมทั้งอ่านผลที่ dilution ของหลอดทดลองสุดท้ายที่ให้ผลบวก weak เหมือนกัน ซึ่งการศึกษาของ AuBuchon JP และคณะ¹⁵ แสดงให้เห็นว่าการอ่านค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีจากหลอดทดลองที่ให้ผลบวก weak สามารถลดความแตกต่างของผลการตรวจระหว่างผู้ทดสอบได้ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Shirey RS และคณะ ยังใช้ cassette ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics ในการตรวจหาค่าไตเตอร์ชนิด IgG สำหรับวิธี CAT เหมือนกับการศึกษาครั้งนี้

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ ถ้าเปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างทดสอบที่ค่าไตเตอร์เท่ากับค่า concordance rate ของไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ในหมู่เลือด O มีค่าน้อยกว่าผลการศึกษาของ Shirey RS และคณะ คือมีค่าเท่ากับ 56.67% (34 ราย) และ 43.33% (26 ราย) ตามลำดับ โดยตัวอย่างทดสอบอีก 25 ราย (41.67%) และ 31 ราย (51.67%) มีค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ต่างกันไม่เกิน 1 dilution ตามลำดับ สำหรับจำนวนตัวอย่างทดสอบที่เหลือ 1 ราย (1.67%) และ 3 ราย (5.00%) มีค่าไตเตอร์ของ anti-A และ anti-B ชนิด IgG ต่างกัน 2 dilution ตามลำดับ (Table 1) ความแตกต่างของผลการศึกษานี้จะมีสาเหตุจากการศึกษาครั้งนี้ทดสอบโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติด้วยวิธี auto-CAT ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวกว่าวิธี gel ที่เป็น manual-CAT ที่ใช้ทดสอบในการศึกษาของ Shirey RS และคณะ

จากการประเมินความสัมพันธ์ของค่าไตเตอร์ของ ABO antibodies ทั้งชนิด IgM และ IgG ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี CAT และด้วยวิธี CTT ในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด พบว่าให้ผลในทิศทางเดียวกันโดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Spearman correlation coefficient; rho) ของค่าไตเตอร์ชนิด IgG อยู่ในระดับสูงมาก (ค่า rho > 0.90) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของค่าไตเตอร์ชนิด IgM อยู่ในระดับสูง (rho > 0.73) (Table 3) แสดงให้เห็นว่าค่าไตเตอร์ของ ABO antibodies ที่ตรวจด้วยวิธี CAT และด้วยวิธี CTT มีความสัมพันธ์กันในระดับที่สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ การศึกษา¹⁹⁻²⁰ อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างดีนี้อาจจะระบุถึงความสอดคล้อง (agreement) ของสองวิธีการได้ไม่ชัดเจน จึงควรวิเคราะห์จากวิธีการทดสอบ agreement อื่นๆ ประกอบด้วย

สถิติ Bland-Altman plot³¹ เป็นวิธีการทางสถิติที่ใช้วิเคราะห์ agreement ของสองวิธีการ โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง (mean difference) ของผลการทดสอบที่ได้จากวิธีใหม่กับวิธีมาตรฐานในแต่ละตัวอย่างทดสอบ ค่า mean difference ที่ดีที่สุดคือเท่ากับศูนย์ ซึ่งเป็นไปไม่ได้ในความเป็นจริง ในทางปฏิบัติจึงยอมรับค่า mean difference ณ ตำแหน่งต่างๆ ที่อยู่ในช่วง ± 1.96 SD หรือเรียกว่าช่วง limit of agreement (LOA) ที่ 95% confident interval เนื่องจากข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-normality) จึงต้อง transform ค่าไตเตอร์ให้อยู่ในรูป natural log ก่อนนำมาทดสอบด้วยสถิติ Bland-Altman plot ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าในหมู่เลือด A, B และ O ค่า mean difference ระหว่างค่า log titer ของ ABO antibodies ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับด้วยวิธี CTT มีค่าใกล้เคียงกัน (-0.39 ถึง 0.53) ในทุกหมู่เลือด (Table 4) แสดงให้เห็นว่าค่าไตเตอร์ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับด้วยวิธี CTT มีค่าใกล้เคียงกัน หรือมีความสอดคล้องกันในระดับดี (good agreement) เมื่อทำการเปลี่ยนค่า log titer (antilog value) กลับเป็นค่าไตเตอร์จริง พบว่าค่า mean difference ระหว่างค่าไตเตอร์ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับด้วยวิธี CTT มีค่าสูงสุดไม่เกิน 1.70 (Table 5) ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างที่น้อยมาก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะไม่มีผลกระทบต่อค่าไตเตอร์จริงในผู้ป่วย

ผลการวิเคราะห์ agreement ระหว่างค่าไตเตอร์ที่ตรวจด้วยวิธี CAT กับวิธี CTT ด้วยสถิติ Lin's Concordance²⁷ ในการศึกษาพบว่า ค่า Lin's Concordance correlation coefficient (Lin's CCC) ของค่าไตเตอร์ ชนิด IgM และชนิด IgG มากกว่าหรือเท่ากับ 0.72 และ 0.88 ตามลำดับ (Table 3) แสดงให้เห็นว่าผลการตรวจค่าไตเตอร์ชนิด IgM และชนิด IgG จากทั้งสองวิธีมี agreement ในระดับปานกลางถึงสูงมากตามลำดับ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Bhangale A และคณะ¹⁹ ที่ศึกษาเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของ ABO antibodies ชนิด IgG ที่ตรวจด้วยวิธี CAT

และด้วยวิธี CTT พบว่าทั้งสองวิธีมีค่า Lin's CCC เท่ากับ 0.58 ความแตกต่างของผลการศึกษาน่าจะเกิดจากวัสดุและวิธีการที่ต่างกัน โดยการศึกษาของ Bhangale A และคณะ ใช้วิธี manual CAT (gel test) ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Diamed, Switzerland รวมทั้งใช้ตัวอย่างพลาสมาทดสอบที่มีการทำลาย IgM และค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี อ่านผลที่ 1+ อย่างไรก็ตาม Bhangale A และคณะ พบว่าค่า Spearman correlation coefficient ของสองวิธีเท่ากับ 0.94 ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้ และได้สรุปผลการศึกษาว่าผลการตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies ด้วยวิธี CAT และด้วยวิธี CTT มีความสัมพันธ์กันสูงมาก

แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบ ABO มีคุณสมบัติเป็นทั้งชนิด IgM และ IgG แต่แอนติบอดีชนิด IgM ของหมู่เลือดระบบ ABO มีคุณสมบัติพิเศษสามารถทำปฏิกิริยาได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 4-37°C เช่นเดียวกับแอนติบอดีชนิด IgG ดังนั้นการตรวจหาค่าไตเตอร์ของ ABO antibodies ชนิด IgG ที่ถูกต้องที่สุด ควรจะกำจัดแอนติบอดีชนิด IgM ในพลาสมา ก่อนนำไปทดสอบที่ IAT ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้สาร Dithiothreitol (DTT) ในการทำลาย IgM วิธีการนี้จะช่วยลดการรบกวนจากแอนติบอดีชนิด IgM ออกจาก IgG ได้²² และไม่ทำให้ผลการตรวจไตเตอร์ชนิด IgG สูงกว่าค่าจริง มีหลายการศึกษาที่รายงานว่าโดยเฉลี่ยค่าไตเตอร์ชนิด IgG ที่ตรวจจากพลาสมาที่ไม่ได้ใช้ DTT สูงกว่าพลาสมาที่ใช้ DTT^{18,20,28} แต่เนื่องจากขั้นตอนการนำ DTT มา treat พลาสมา ทำยากและใช้เวลานาน 30-60 นาที³³ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่รวมทั้งธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จึงไม่นำ DTT มาใช้ในงานประจำ และยอมรับว่าผลการทดสอบที่ IAT คือค่าไตเตอร์ชนิด IgG ซึ่งความจริงควรรายงานเป็นค่า total antibody ตามมาตรฐานของ College of American Pathologists^{16,28}

การตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีชนิด IgG ในหลายๆ การศึกษาใช้น้ำยา monospecific anti-IgG สำหรับวิธี CTT และใช้ anti-IgG cassette สำหรับวิธี CAT เพื่อป้องกันผลกระทบจาก

Table 5 Mean difference of ABO antibody titers using antilog value between CTT and CAT

Blood group antibodies (no. samples)	Bias (mean difference)	
	IgM	IgG
Anti-B in blood group A (60)	0.68	0.68
Anti-A in blood group B (60)	0.97	0.84
Anti-A in blood group O (60)	1.58	0.93
Anti-B in blood group O (60)	1.70	1.16
Anti-A in all subjects (120)	1.23	0.33
Anti-B in all subjects (120)	1.07	0.89

complement ซึ่งอาจทำให้ค่าไตเตอร์ชนิด IgG สูงกว่าค่าจริง แต่การศึกษาของ Vanamalar A และคณะ³⁴ สรุปผลวิจัยว่า น้ำยาชนิด monospecific AHG มีความไวในการทดสอบมากกว่าน้ำยาชนิด polyspecific AHG การศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำยา antihuman globulin (AHG) ชนิด polyspecific (IgG & C3d) สำหรับวิธี CTT และใช้ polyspecific cassette สำหรับวิธี CAT เนื่องจากธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ใช้วัสดุและน้ำยาทดสอบนี้ในงานประจำ ประกอบกับผู้วิจัยได้มีการนำตัวอย่างพลาสมาของผู้บริจาคโลหิต จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวม 140 ตัวอย่าง มาทดสอบหาค่าไตเตอร์ชนิด IgG ของ ABO antibodies ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) เปรียบเทียบระหว่างการใช้ polyspecific cassette และ anti-IgG cassette ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics ผลการตรวจพบว่าพลาสมาตัวอย่าง 63 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45 ให้ค่าไตเตอร์ชนิด IgG เท่ากัน และมี 77 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55 ที่ค่าไตเตอร์ชนิด IgG จาก anti-IgG cassette มีค่าสูงกว่า 1 dilution ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างที่ไม่มีนัยยะสำคัญตามมาตรฐาน AABB Technical manual²⁴

ข้อจำกัดในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีเท่านั้น ส่วนใหญ่จึงมีระดับไตเตอร์ของ ABO antibodies สูง ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าต่อไปในอนาคตควรมีการศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย และควรเลือกกลุ่มผู้ป่วยปลูกถ่ายไตแบบ ABO incompatible เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องรักษาระดับของไตเตอร์ของ ABO antibodies ให้ต่ำตั้งแต่ก่อนการปลูกถ่ายไต และต้องรักษาระดับของไตเตอร์ไม่ให้สูงตลอดชีวิต ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหาไตเตอร์ของ ABO antibodies โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (ORTHO VISION Analyzer) ด้วยวิธี CAT และด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง (CTT) ให้ผลการตรวจที่มีความสัมพันธ์และมีความสอดคล้องกันสูง สะท้อนให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือ (reliability) ของวิธี CAT เมื่อประกอบกับข้อดีอื่นๆ เช่น ความรวดเร็วในการรายงานผล ให้ผลการตรวจที่มีความแน่นอนและแม่นยำสูง (objective & reproducibility) ซึ่งช่วยให้ไม่เกิดความแตกต่างของผลการตรวจในเจ้าหน้าที่แต่ละคน หรือในแต่ละครั้งของการทดสอบ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่สุดที่แพทย์ต้องการเพื่อเป็นข้อมูลในการตรวจวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยให้ประสบความสำเร็จ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยปลูก

ถ่ายไตแบบ ABO incompatible ซึ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่แพทย์ส่งตรวจ antibody titration มากที่สุดในปัจจุบันของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เพราะฉะนั้นผลการวิจัยนี้จะนำไปสู่การใช้วิธี CAT โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติแบบ fully automation (ORTHO VISION Analyzer) ที่ปัจจุบันนี้ใช้สำหรับเตรียมเลือดให้ผู้ป่วยในธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย มาใช้ตรวจ antibody titration แทนวิธี CTT เพื่อให้แพทย์และผู้ป่วยได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ และนำมาซึ่งความรวดเร็วในการรายงานผล ส่งผลถึงความปลอดภัยของผู้ป่วยและลดอัตราการเกิด AMR ในผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายไตแบบ ABO incompatible ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ที่ปรึกษาศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย และรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงพรรณดี วัฒนบุญยงเจริญ หัวหน้าฝ่ายเวชศาสตร์ชั้นสูตโร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้คำแนะนำในการเขียนต้นฉบับ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดผู้บริจาคโลหิตในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Harmening DM. The ABO blood group system. In: Harmening DM, editor. *Modern blood banking and transfusion practices*. 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1999. p. 90-100.
- Virginia VT, Chair and editor. *ABO system. Technical manual*. 13th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1999. p. 270-84.
- Worel N, Kalhs P, Keil F, Prinz E, Moser K, Schulenburg A, et al. ABO mismatch increases transplant-related morbidity and mortality in patients given nonmyeloablative allogeneic HPC transplantation. *Transfusion*. 2003;43:1153-61.
- Warner PR, Nester TA. ABO-incompatible solid-organ transplantation. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(Suppl):S87-94.
- Alexandre GP, Squifflet JP, De Bruyere M, Latinne D, Reding R, Gianello P, et al. Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant Proc*. 1987;19:4538-42.
- Tanabe K, Takahashi K, Sonda K, Tokumoto T, Ishikawa N, Kawai T, et al. Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation*. 1998;65:224-8.
- Kobayashi T, Saito K. A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible Transplantation Committee. *Xenotransplantation*. 2006;13:136-40.

8. Avihingsanon Y, Townamchai N, Praditpornsilpa K, Tiranathanagul K, Susantitaphong P, Sirichindakul B, et al. Living-donor kidney transplantation across ABO barriers: The first case in Thailand. *Asian Biomedicine*. 2009;3:525-9.
9. Townamchai N, Watanaboonyongcharoen P, Onpuns S, Avihingsanon Y. ABO incompatible kidney transplantation. In: Tasanarong A, Kurathong S, editors. *Textbook of organ transplantation*. 1st ed. Bangkok: Text and general publication; 2019. p. 435.
10. Song TJ, Lim CS, Park IS, Lee KN, Jung KH, Choi SY, et al. ABO blood type incompatible liver transplantation in a child. *J Korean Surg Soc*. 1998;55:604-10.
11. Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, Toma H. Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*. 2000;70:1331-5.
12. Tobian AA, Shirey RS, Montgomery RA, Cai W, Haas M, Ness PM, et al. ABO antibody titer and risk of antibody-mediated rejection in ABO-incompatible renal transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10:1247-53.
13. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Hillyer CD. ABO mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfus Apher Sci*. 2010;42:83-8.
14. Kumlien G, Wilpert J, Safwenberg J, Tyden G. Comparing the tube and gel techniques for ABO antibody titration, as performed in three European centers. *Transplantation*. 2007;84(12 Suppl):S17-9.
15. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Vox Sang*. 2008;95:57-65.
16. Kang SJ, Lim YA, Baik SY. Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. *Ann Lab Med*. 2014;34:300-6.
17. Harmening D. Alternative techniques in routine blood bank testing. In: Harmening DM, ed. *Modern blood banking and transfusion practices*. 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1999. p. 546-50.
18. Park ES, Jo KI, Shin JW, Park R, Choi TY, Bang HI, et al. Comparison of total and IgG ABO antibody titers in healthy individuals by using tube and column agglutination techniques. *Ann Lab Med*. 2014;34:223-9.
19. Bhangale A, Pathak A, Pawar S, Jeloka T. Comparison of antibody titers using conventional tube technique versus column agglutination technique in ABO blood group incompatible renal transplant. *Asian J Transfus Sci*. 2017;11:131-4.
20. Matsuura H, Akatsuka Y, Matsuno T, Sugiura Y, Arakawa S, Oikawa S, et al. Comparison of the tube and column agglutination technique for anti-A/-B antibody titration in healthy individuals. *Vox Sang*. 2018;113:787-94.
21. Nayak S, Makroo RN, Prakash B, Chandra T, Agrawal S, Chowdhry M, et al. Comparative evaluation of five different methods of anti-ABO antibody titration: an Aid for ABO-Incompatible organ transplants. *Ther Apher Dial*. 2019;23:86-91.
22. Shim H, Hwang JH, Kang SJ, Seo HS, Park EY, Park KU, et al. Comparison of ABO isoagglutinin titres by three different method: tube haemagglutination, micro-column agglutination and automated immunohematology analyzer based on erythrocyte-magnetized technology. *Vox Sang*. 2020;115:233-40.
23. Cho CH, Kim HN, Yun SG; Choi GR, Choi JY, Kim JS, et al. Evaluation of ABO antibody titration using tube and column agglutination techniques. *Lab Med Online*. 2011;1:57-63.
24. Method 3-7. Antibody titration procedure. In: Roback JD, Coombs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank; 2008. p. 909-11.
25. Method 3-2-1. Saline indirect antiglobulin test procedure. In: Roback JD, Coombs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008. p. 900.
26. Hinkle DE, Wiersma W, Jurs SG. *Applied statistics for the behavioral sciences*. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin; 2003.
27. McBride GB. A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient. *NIWA Client Report: HAM2005-062*.
28. Kang MG, Lee SJ, Oh JS, Lim YA. Comparison of ABO isoagglutinin titers by different tube hamagglutination techniques. *Korean J Blood Transfus*. 2009;20:227-34.
29. Lee EY, Kim S, Kim HO, Kwon SW, Kim DW, Han KS. Survey analysis of ABO antibody titration at four university hospital in Korea. *Korean J Blood Transfusion*. 2011;22:24-30.
30. Shirey RS, Cai W, Robert A, Montgomery, Chhibber V, Paul M, et al. Streamlining ABO antibody titrations for monitoring ABO-incompatible kidney transplants. *Immunohematology*. 2010;50:631-4.
31. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of measurement. *Lancet*. 1986;1:307-10.
32. Okuno T, Kondelis N. Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J Clin Pathol*. 1978;31:1152-5.
33. Method 3-8. Using sulphhydryl reagents to distinguish IgM from IgG antibodies. In: Roback JD, Coombs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008. p.911-2.
34. Vanamala A, Shanthala DAM, Sitalakshmi S, Karuna K. Evaluation of the use of gel card system for assessment of direct coombs test: weighing the pros and cons. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2012;28:15-8.