

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและเครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ column agglutination

test

พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย สุกัญญา ปัญญาศุภกฤษณ์ นภัสวรรณ ศรีนาง และ ศิริลักษณ์ เพ็ชรเจริญ
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

บทนำ การตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ในผู้ป่วยตั้งครรรภ์ เป็นการตรวจเชิงกึ่งปริมาณ เพื่อประเมินความเสี่ยงทารกในครรภ์ ซึ่งการตรวจด้วย conventional tube test (CTT) ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่อาศัยความชำนาญและความเที่ยงของผู้ทำการทดสอบ เครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ column agglutination test (CAT) เข้ามามีบทบาทในการตรวจหาความแรงของแอนติบอดี เพื่อให้เกิดความคงที่ของผลการตรวจมากที่สุด อีกทั้งยังมีความถูกต้องมากกว่า CTT **วัตถุประสงค์** เพื่อเปรียบเทียบความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง โดยใช้วิธีการตาม Australian National Immunohaematology Continuing Education (Australian NICE) เทียบกับเครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ column agglutination test, CAT (Ortho VisionMax) และสามารถนำเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมาใช้ตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ในตัวอย่างผู้ป่วยที่ส่งตรวจที่งานห้องปฏิบัติการเมดิคอลิตแดง ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย **วัสดุและวิธีการ** ทำการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยคนไทย จำนวนทั้งสิ้น 30 ราย ทำการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง โดยใช้วิธีการตามมาตรฐาน Australian NICE และเครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ CAT อ่านค่าความแรงของแอนติบอดีที่ปฏิกิริยา 1+ สุดท้าย และทำการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติเดิมซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อเปรียบเทียบความเที่ยงของเทคนิคการตรวจ **ผลการศึกษา** จากการศึกษาเปรียบเทียบค่าความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ในตัวอย่างผู้ป่วย 25 ราย และตัวอย่างจากการเข้าร่วมการประเมินคุณภาพภายนอกของ The Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) ประเทศออสเตรเลีย 5 ราย พบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงไม่เกิน 1 ไตเตอร์ที่ยอมรับได้โดยส่วนมากผลการตรวจจาก CAT ให้ผลสูงกว่า CTT ร้อยละ 53 อย่างไรก็ตาม พบว่าผลที่ได้นั้นเท่ากันและต่ำกว่า ร้อยละ 27 และ 20 ตามลำดับ **สรุป** การตรวจความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ CAT ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวิธี CTT ซึ่งใช้วิธีตาม Australian NICE ซึ่งจากผลการทดลองนี้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ในธนาคารเลือดอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลที่เที่ยงตรงและถูกต้องได้

คำสำคัญ : ● การตรวจหาความแรงของแอนติบอดี ● Column agglutination test ● การตรวจแอนติบอดีในหญิงตั้งครรรภ์
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2563;30:353-60.

ได้รับต้นฉบับ 30 ตุลาคม 2563 แก้ไขบทความ 6 พฤศจิกายน 2563 รับลงตีพิมพ์ 11 พฤศจิกายน 2563

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 02-263-9600 ต่อ 1330 และ 1331 Email: ploymanee.s@redcross.or.th

Original Article

Comparison of IgG antibody titers using conventional tube technique and automated column agglutination test

Ploymanee Suwanwootichai, Sukanya Panyasuphakul, Napatsawan Srinang and Sirilak Phiencharoen

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Introduction: Antibody titration in prenatal study is a semi-quantitative method to predict the severity of hemolytic disease of the fetus and newborn. Generally, a conventional tube test (CTT) is the standard method that relies on individual personal technique and precision. Automatic innovation has been involved in the role of titration using column agglutination test (CAT) to control the stability of the results, which is more accurate than CTT **Objective:** To compare titers of IgG antibodies between the CTT, referred to Australian National Immunohaematology Continuing Education (Australian NICE) and column agglutination test, CAT (Ortho VisionMax) and implement in the routine prenatal study in Red Cell Reference Laboratory, National Blood Centre, Thai Red Cross Society. **Materials and Methods:** Altogether, 30 samples were tested for antibody titration by Australian NICE conventional tube test and an automated CAT. The results were evaluated in the last dilution that gave the last 1+ grading. In addition, 20 samples were retested in triplicate by the CAT to compare the precision of the technique. **Results:** A study comparing IgG antibody titers in 25 patient samples and 5 RCPA EQA samples were not significantly different, according to one acceptable titer. Most of the results using the CAT were higher than the CTT by 53%. However, the same and lower results obtained were 27% and 20%, respectively. **Conclusion:** The IgG antibody titration using an automated CAT was not significantly different from Australian NICE conventional tube test. This data could be applied in other blood bank laboratories to provide reliable and accurate results.

Keywords : ● Antibody titration ● Column agglutination test ● Antibody titration in prenatal study

J Hematol Transfus Med. 2020;30:353-60.

บทนำ

แอนติบอดีชนิด IgG สามารถผ่านรกและทำให้เกิดภาวะซีดของทารกขณะอยู่ในครรภ์และแรกเกิด (hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN) การตรวจความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG เป็นการตรวจเชิงกึ่งปริมาณ ซึ่งมีความสำคัญต่อการประเมินความเสี่ยงของทารกในครรภ์ ประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการรักษาและการเตรียมส่วนประกอบโลหิต นอกจากนี้ การตรวจความแรงของแอนติบอดี ยังสามารถใช้เปรียบเทียบความแรงของแอนติเจนที่แสดงออกบนเม็ดโลหิตแดง เพื่อใช้ในการสรุปหมู่โลหิตต่าง ๆ ได้ ปัจจุบันการตรวจความแรงของแอนติบอดีด้วยวิธีหลอดทดลอง (conventional tube test, CTT) เป็นวิธีมาตรฐาน แต่เนื่องจากการตรวจความแรงของแอนติบอดีด้วยหลอดทดลองนั้นต้องใช้เจ้าหน้าที่ในการทดสอบ ทำให้มีความความแตกต่างของผลการทดสอบ และสามารถดำเนินการตรวจได้ปริมาณน้อย อีกทั้งวิธีการตรวจตามมาตรฐาน American Association of Blood Banks (AABB) และวิธีตามมาตรฐาน National Australian Immunohaematology Continuing Education (Australian NICE) ซึ่งมีวิธีการตรวจที่แตกต่างกัน อาจทำให้เกิดความแปรปรวนระหว่างวิธีการทดสอบได้เช่นกัน การนำ column agglutination test (CAT) มาใช้เพื่อตรวจความแรงของแอนติบอดีจึงเข้ามามีบทบาทในงานธนาคารเลือดมากขึ้น

จากการศึกษาของ AuBuchon JP และคณะ¹ ใช้ gel card ในการตรวจวัดความแรงของแอนติบอดีเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานนั้น ให้ผลไม่แตกต่างกันเมื่อแปลผลความแรงโดยใช้ปฏิกิริยา 1+ สุดท้าย และพบว่าการใช้ gel card ในการทดสอบและแปลผลลดความแตกต่างของผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ 19 แห่งได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การศึกษาของ Adriaansen MJ และ Perry HE² พบว่า การใช้ CAT ในการตรวจความแรงของแอนติบอดี ให้ผลไม่แตกต่างกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลองเช่นเดียวกัน

เมื่อมีการนำเครื่องตรวจอัตโนมัติด้วยเทคนิค CAT เข้ามามีบทบาทในงานธนาคารเลือดเพิ่มขึ้น จึงมีการศึกษาการตรวจความแรงของแอนติบอดีโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติแพร่หลายมากขึ้น จากรายงานของ Adkins BD และคณะ³ ซึ่งได้ศึกษาการตรวจความแรงของแอนติบอดีโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho Vision (Ortho Clinical Diagnostic, Raritan, NJ) พบว่า การใช้เครื่องตรวจอัตโนมัตินี้ ให้ผลการทดสอบความแรงของแอนติบอดีในหมู่โลหิต ABO และ non-ABO ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานหลอดทดลองและให้ผลความแรงของแอนติบอดีไม่ต่างกันเกิน 1 titer ซึ่งเป็นความแรงที่ยอมรับได้ของการทดสอบ

อย่างไรก็ตาม เกณฑ์การแปลผลความแรงของแอนติบอดีโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ CAT นั้น ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบค่าความแรงของแอนติบอดีหมู่โลหิตชนิด IgG ที่สำคัญทางคลินิก ด้วยวิธี CTT อ้างอิงวิธีการตาม Australian NICE⁴ เปรียบเทียบกับการใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ CAT และทดสอบความคงตัวของผลการทดสอบความแรงของแอนติบอดีโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ เพื่อให้สามารถนำผลการทดสอบมาใช้ในงานตรวจความแรงของแอนติบอดีในผู้ป่วยตั้งครรภ์ และลดความแปรปรวนของผลการทดสอบความแรงของแอนติบอดี ในตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ งานห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตแดง ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

1. ตัวอย่าง EDTA plasma หรือ serum ของผู้ป่วยที่มี alloantibody ชนิด IgG ที่ผ่านการตรวจระบุชนิดของแอนติบอดีโดยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax จำนวน 25 ราย ประกอบด้วย anti-D จำนวน 4 ราย anti-E จำนวน 5 ราย anti-e จำนวน 1 ราย anti-M จำนวน 1 ราย anti-Mi^a จำนวน 6 ราย anti-Jk^a จำนวน 1 ราย anti-Jk^b จำนวน 3 ราย anti-Fy^b จำนวน 2 ราย และ anti-Di^a จำนวน 2 ราย ทำการตรวจความแรงของแอนติบอดีในวันเดียวกันด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลองตามวิธีการ Australian NICE และตรวจด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax⁵ ทำการตรวจซ้ำบนเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax เครื่องเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง จำนวน 20 ราย ภายในวันเดียวกัน เพื่อประเมินความแปรปรวนของผลการทดสอบ การวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสโครงการ 22/2563

2. ตัวอย่าง External QC samples จาก The Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) ซึ่งเป็น anti-D ที่ทราบความแรงของแอนติบอดีตามผลการเข้าร่วมประเมินคุณภาพกับองค์กรภายนอก ทำการตรวจความแรงของแอนติบอดีในวันเดียวกันด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ตามวิธีการ Australian NICE⁴ และเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax⁵ จำนวน 5 ราย

น้ำยาที่ใช้ทดสอบ

1. Panel cells lot 63090 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และเตรียมเป็น 0.8% suspension ใน ORTHO 0.8% Red Cell Diluent (Ortho Clinical Diagnostic)

2. น้ำยา antihuman globulin (AHG) anti-IgG (Immulab, VIC, Australia)
3. Coombs' Control Cells (CCC) ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
4. 5% Bovine serum albumin (BSA) เตรียมใน Buffer saline PBS pH 7.3
5. Anti-IgG monoclonal cassette (Ortho Biovue® system, Ortho Clinical Diagnostic, Switzerland)

วิธีการศึกษา

1. การตรวจหาค่าความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี Australian NICE CTT⁴

ทำการเจือจางซีรัมหรือพลาสมาที่ทดสอบแบบ 2-fold dilution โดยใช้ 5% BSA ที่เตรียมใน PBS pH 7.3 โดยเติม 5% BSA ปริมาตร 200 μ L ในแต่ละหลอด จำนวน 12 หลอด (ความแรงตั้งแต่ undiluted ถึง 1:1024) ใส่ซีรัมหรือพลาสมาที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 200 μ L ลงในหลอด undiluted และ 1:2 ผสมให้เข้ากัน ดูดซีรัมหรือพลาสมาที่เจือจางในหลอด 1:2 ปริมาตร 200 μ L ไปสู่หลอดทดลอง 1:4 ต่อไป จนครบ 12 หลอด คือ หลอดที่ 1:1024 และดูดซีรัมหรือพลาสมาที่เจือจางที่ 1:1024 ทั้งปริมาตร 200 μ L จะได้ซีรัมหรือพลาสมาในแต่ละหลอดทดลองปริมาตร 200 μ L ทำการหยดเซลล์ที่มีแอนติเจน positive ตรงกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ โดยเลือกเซลล์ที่เป็น homozygous (Table 1) ซึ่ง suspend ในน้ำเกลือเป็น 3-5% suspension cells ปริมาตร 50 μ L ทุกหลอดผสมให้เข้ากันและ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 30 นาที ครบเวลานำมาล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้งด้วยเครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติ (Helmer scientific, USA) หยด antihuman globulin (AHG) anti-IgG จำนวน 2 หยดในทุกหลอดทดลอง ปั่นอ่านปฏิกิริยาด้วยเครื่องปั่นอ่านปฏิกิริยาหลอดทดลอง (Helmer

scientific, USA) ที่ 3,000 rpm นาน 15 วินาที อ่านปฏิกิริยาและบันทึกผลการทดสอบที่เห็นด้วยตาเปล่า กรณีอ่านผลด้วยตาเปล่าว่าเป็น negative ให้อ่านปฏิกิริยาที่กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Olympus, Japan) เมื่ออ่านปฏิกิริยาที่ได้เป็น negative ด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้หยด CCC 1 หยด ผสมให้เข้ากันและปั่นอ่านปฏิกิริยาทันทีด้วยความเร็ว 3,000 rpm 15 วินาที หากผลที่ได้เป็น negative จริง หลังการหยด CCC ต้องให้ผล positive จึงยืนยันได้ว่าไม่ใช่ผลปลอม การอ่านค่าความแรงของแอนติบอดีอ่านเป็นส่วนกลับของ dilution ที่ทำการเจือจางที่พบปฏิกิริยา 1+ สุดท้าย

2. การตรวจหาค่าความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติวิธี CAT เครื่อง Ortho VisionMax (Ortho Clinical Diagnostic, Switzerland)⁵

นำซีรัมหรือพลาสมาที่ต้องการทดสอบ ระบุตัวอย่างด้วยรหัสบาร์โค้ด ทำการตรวจวิเคราะห์ความแรงของแอนติบอดีด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax โดยเลือกเซลล์ที่ใช้ทดสอบเซลล์เดียวกับที่ทดสอบด้วยวิธี CTT ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 0.8% suspension ใน ORTHO 0.8% Red Cell Diluent เลือกโปรไฟล์ titration และเลือก dilution ที่ต้องการทดสอบตั้งแต่ 1:1 (undiluted) ถึง 1:1024 ทำการทดสอบโดยใช้ anti-IgG cassette โดยใช้เซลล์ 50 μ L และซีรัมหรือพลาสมา 40 μ L incubate 37°C 15 นาที ปั่นอ่านโดยใช้หลักการ biphasic phase 5 นาที การอ่านค่าความแรงของแอนติบอดีอ่านเป็นส่วนกลับของ dilution ที่ทำการเจือจางที่พบปฏิกิริยา 1+ สุดท้ายจากผลที่ได้จากเครื่องตรวจอัตโนมัติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลของความแรงของแอนติบอดีที่ได้จากการอ่านปฏิกิริยาที่ 1+ สุดท้ายของวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและเครื่องตรวจอัตโนมัติ มาเปรียบเทียบโดยใช้ค่าสถิติ Wilcoxon signed rank test และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่าง 2 วิธีโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

Table 1 Antibody specificity in 30 samples tested with homozygous cells

Antibody specificity	Number	Type of homozygous cells
Anti-D	9	R2R2 (D+C-E+c+e-)
Anti-E	5	R2R2 (D+C-E+c+e-)
Anti-e	1	R1R1 (D+C+E-c-e+)
Anti-M	1	M+N-
Anti-Mi ^a	6	Mi(a+)
Anti-Jk ^a	1	Jk(a+b-)
Anti-Jk ^b	3	Jk(a-b+)
Anti-Fy ^b	2	Fy(a-b+)
Anti-Di ^a	2	Di(a+b+)*

*Limitation of homozygous cells in Diego blood group system from the prevalence of Di(a+b-) is less than 0.01%²⁶

Spearman correlation coefficient โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistic Base Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) และกำหนดค่าระดับความสำคัญ ค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

จากการนำตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่าง External QC samples จาก The Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA) จำนวน 30 ราย ประกอบด้วยแอนติบอดีชนิด IgG ได้แก่ anti-D จำนวน 9 ราย anti-E จำนวน 5 ราย anti-e จำนวน 1 ราย anti-M จำนวน 1 ราย anti-Mi^a จำนวน 6 ราย anti-Jk^a จำนวน 1 ราย anti-Jk^b จำนวน 3 ราย anti-Fy^b จำนวน 2 ราย และ anti-Di^a จำนวน 2 ราย มาตรวจหาความแรงของแอนติบอดีด้วยวิธี CTT ใช้วิธีการตาม Australian NICE และตรวจด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax พบว่า ผลจากการตรวจตัวอย่างทั้งหมดมีความสอดคล้องกันด้วยค่าความแรงไม่เกิน 1 titer รายละเอียดดังแสดงใน Table 2

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ของค่าความแรงของแอนติบอดี จากการตรวจโดยวิธี CTT และเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax พบว่า มีความสัมพันธ์กันไปใน

ทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Spearman correlation coefficient; Rho) ของความแรงของแอนติบอดี มีค่าเท่ากับ 0.916 เมื่อ ค่า p -value น้อยกว่า 0.05 และการวิเคราะห์ความคงที่ของผลการทดสอบความแรงของแอนติบอดีโดยใช้ค่า Wilcoxon signed rank test (U test) พบว่า การตรวจความแรงของแอนติบอดีด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax ให้ผลการตรวจที่ไม่แตกต่างกันทางค่าสถิติ (ค่าเท่ากับ 0.684, 0.317, 0.833 เมื่อค่าระดับความสำคัญ ค่า p -value น้อยกว่า 0.05) ซึ่งบ่งบอกว่าการตรวจความแรงของแอนติบอดีด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัตินี้ มีความคงที่สูง ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

การตรวจพบแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตชนิด IgG ในซีรัมหรือพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ บ่งบอกความเสี่ยงของทารกที่อาจเกิดภาวะซีดหลังคลอดหรือภาวะ HDFN การตรวจความแรงของแอนติบอดีมีความสำคัญในการประเมิน severity ของทารก ซึ่งจัดเป็นการทดสอบที่ต้องอาศัยวิธีที่ได้มาตรฐาน มีความแม่นยำ เพื่อให้การประเมินความเสี่ยงของทารกในครรภ์มีความถูกต้อง ส่งผลต่อการตัดสินใจของแพทย์เพื่อการรักษาต่อไป เนื่องจากการตรวจกรอง

Table 2 Comparison of the IgG antibody titers between conventional tube test (CTT) and automated column agglutination test (CAT) (n = 30)

Number	IgG antibodies	Titers		Number	IgG antibodies	Titers	
		CTT*	CAT*			CTT*	CAT*
1	Anti-D	128	128	16	Anti-M	1	1
2	Anti-D	64	64	17	Anti-Mi ^a	64	32
3	Anti-D	128	128	18	Anti-Mi ^a	64	32
4	Anti-D	32	32	19	Anti-Mi ^a	16	32
5	Anti-D	32	64	20	Anti-Mi ^a	8	16
6	Anti-D	256	512	21	Anti-Mi ^a	2	2
7	Anti-D	128	256	22	Anti-Mi ^a	1	2
8	Anti-D	128	256	23	Anti-Jk ^a	2	4
9	Anti-D	8	8	24	Anti-Jk ^b	32	64
10	Anti-E	16	32	25	Anti-Jk ^b	16	8
11	Anti-E	32	16	26	Anti-Jk ^b	8	16
12	Anti-E	32	64	27	Anti-Fy ^b	64	128
13	Anti-E	32	64	28	Anti-Fy ^b	8	16
14	Anti-E	16	16	29	Anti-Di ^a	32	16
15	Anti-e	1	1	30	Anti-Di ^a	8	8

*Spearman correlation coefficient analysis (rho) between CTT and CAT are 0.916 (p -value < 0.05). The results using the CAT were higher than the CTT by 53%, the same and lower results obtained were 27% and 20%, respectively.

Table 3 Comparison of IgG antibody titers that tested by automated column agglutination test (CAT) in triplicate (n = 20)

Number	IgG antibodies	Titers			Number	IgG antibodies	Titers		
		1*	2*	3*			1*	2*	3*
1	Anti-D	8	8	8	11	Anti-Mi ^a	16	16	16
2	Anti-D	256	128	256	12	Anti-Mi ^a	2	2	2
3	Anti-E	32	32	64	13	Anti-Jk ^a	4	4	4
4	Anti-E	16	32	16	14	Anti-Jk ^b	64	64	64
5	Anti-E	64	64	64	15	Anti-Jk ^b	8	8	8
6	Anti-E	64	64	64	16	Anti-Jk ^b	16	16	16
7	Anti-E	8	8	8	17	Anti-Fy ^b	128	128	128
8	Anti-e	1	1	1	18	Anti-Fy ^b	16	32	16
9	Anti-M	1	1	1	19	Anti-Di ^a	16	8	16
10	Anti-Mi ^a	32	32	32	20	Anti-Di ^a	8	8	8

* Wilcoxon signed rank analysis (U test) of triplicate testings are 0.684, 0.317 and 0.833

แอนติบอดีในหญิงตั้งครรภ์ในประเทศไทยยังไม่เป็นข้อบังคับ ทำให้ การตรวจ pre-natal study ของโรงพยาบาลหลายแห่ง ไม่ได้รวม การตรวจกรองแอนติบอดีในหญิงตั้งครรภ์ จึงไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนว่า ในหญิงตั้งครรภ์คนไทยนั้นพบแอนติบอดีชนิดใดมากที่สุดที่ทำให้ ทารกเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงถูกทำลายหลังคลอด แต่จากรายงาน ผู้ป่วยพบว่า ในประเทศไทยมีรายงานทารกที่มีภาวะเม็ดเลือดแดง แดงจากแอนติบอดีของมารดาจากระบบ ABO⁶⁻⁸ ระบบ Rh (เกิด จาก anti-D^{7,9-12}, anti-E^{8,13,14}, anti-c¹⁵, anti-C, anti-e และ anti-Ce¹⁶) ระบบ Kidd⁸ ระบบ MNS¹⁷ และระบบ P1PK¹⁸ ซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกันไป นอกจากนี้ anti-Mi^a ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ HDFN สามารถพบได้มากในประชากรคนจีน ฮองกง และไต้หวัน^{19,20}

การศึกษาการตรวจความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG บนเครื่อง ตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax ที่ใช้หลักการ CAT มีความ สอดคล้องกับการตรวจโดยใช้วิธี CTT วิธีการตาม Australian NICE ซึ่งใช้ระยะเวลาในการทดสอบสั้นกว่า คือเวลา incubate ลดลงจาก 30 นาทีเป็น 15 นาที ใช้ปริมาตรตัวอย่างน้อยกว่า จาก วิธีหลอดทดลองต้องใช้ตัวอย่างซีรัมหรือพลาสมาปริมาตร 400 µL ในขณะที่เครื่องตรวจอัตโนมัตินี้จะใช้ตัวอย่างปริมาตร 350 µL อีกทั้งไม่มีขั้นตอนการปั่นล้างเซลล์ ซึ่งช่วยลดความผิดพลาดของ ผลลบล้อมในขั้นตอน anti-human globulin phase ได้ การ ตรวจโดยใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ มีความคงที่สูง แตกต่างจากการ ตรวจโดยใช้วิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ ของผู้ปฏิบัติงานสูง ทั้งการเจือจางซีรัมหรือพลาสมาและการอ่านผล นอกจากนี้ การใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติสามารถควบคุมคุณภาพผล

การทดสอบ และสอบทวนการดำเนินการต่างๆ ตั้งแต่ นำตัวอย่าง เข้าเครื่องจนถึงผลการทดสอบเสร็จสิ้น ซึ่งทำให้สามารถควบคุม คุณภาพการทดสอบทางธนาคารเลือดได้เป็นอย่างดี

แม้ว่าการอ่านผลความแรงของแอนติบอดีบนเครื่องตรวจอัตโนมัติ นั้นไม่มีความชัดเจน ในบางห้องปฏิบัติการอาจอ้างถึงการอ่านปฏิกิริยา ที่ weak สุดท้าย หรือ 1+ สุดท้าย แต่การศึกษาโดย AuBuchon JP และคณะ¹ เปรียบเทียบห้องปฏิบัติการจำนวน 19 แห่ง ด้วย ตัวอย่าง 35 ราย พบว่าห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบความแรง ของแอนติบอดี ที่อ่านปฏิกิริยา weak สุดท้าย หรือ 1+ สุดท้าย ให้ผลความแรงของแอนติบอดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ดังนั้นการอ่านผลโดยใช้ปฏิกิริยาที่ได้ 1+ สุดท้าย เช่นเดียวกับวิธี CTT จะช่วยลดความสับสนของผู้ปฏิบัติงาน และให้ผล ไม่แตกต่างกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่อ่านปฏิกิริยา weak สุดท้าย

จากการศึกษานี้พบว่า ความแรงที่ได้จากการตรวจโดยวิธี CTT ซึ่งใช้วิธีการ Australian NICE เปรียบเทียบกับการใช้เครื่องตรวจ อัตโนมัติ Ortho VisionMax ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($Rho = 0.916$ ค่า $p < 0.05$) โดยผลที่ได้ร้อยละ 53 จากเครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax ให้ผลที่สูงกว่าวิธี หลอดมาตรฐาน 1 titer ร้อยละ 27 ให้ผลการทดสอบเท่ากัน และร้อยละ 20 เครื่องตรวจอัตโนมัติ Ortho VisionMax ให้ผล ที่ต่ำกว่าวิธี CTT 1 titer ถือว่ายอมรับได้ตามมาตรฐาน AABB²¹ ดังข้อมูลแสดงใน Table 2

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจความแรงของแอนติบอดีโดยใช้ เครื่องตรวจอัตโนมัติเริ่มแพร่หลายตั้งแต่ปี ค.ศ. 2013 ซึ่งส่วนมาก เปรียบเทียบวิธี CTT ซึ่งอ้างอิงวิธีการ American Association

of Blood Banks (AABB) และนิยมศึกษาในการตรวจ anti-A และ anti-B เพื่อผู้ปลูกถ่ายไตมากกว่าในหญิงตั้งครรภ์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดย Brown H และคณะ²² เปรียบเทียบการตรวจความแรงของแอนติบอดี 4 วิธี ได้แก่ CTT ซึ่งใช้วิธี Australian NICE วิธี CAT ซึ่งใช้ของบริษัท Bio-Rad และ Ortho Clinical Diagnosis และวิธี microplate โดยใช้หลัก Capture-R ซึ่งใช้เครื่อง NEO บริษัท Immucor ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 147 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่า ทั้ง 4 วิธีให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 85 และเครื่องตรวจอัตโนมัติให้ผลที่คงตัวมากกว่าวิธี CTT ถือเป็นข้อแนะนำเพื่อให้ห้องปฏิบัติการพิจารณาการใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติเพื่อตรวจความแรงของแอนติบอดี ทั้งในหญิงตั้งครรภ์และการปลูกถ่ายไต ซึ่งจะเห็นว่าผลการศึกษานี้ ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกับการศึกษาของ Brown H และคณะ²²

ในการศึกษานี้ ใช้น้ำยา monospecific anti-IgG ทั้งวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง และ column ที่ใช้บนเครื่องตรวจอัตโนมัติ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการบางแห่ง ที่อาจจะไม่มีน้ำยา monospecific ใช้ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาโดย Alwar V และคณะ²³ สรุปผลการศึกษาน้ำยาชนิด monospecific anti-IgG มีความไวมากกว่าน้ำยา polyspecific anti-IgG+C3d ในวิธี CTT ที่ใช้ตัวอย่างพลาสมาในการตรวจ เนื่องจากการใช้ monospecific anti-IgG จะลดการรบกวนของคอมพลีเมนต์ ซึ่งทำให้วัฏฏะการเกิดจากแอนติบอดีชนิด IgG ชัดเจนขึ้น ดังนั้นเป็นไปได้ว่ากรณีห้องปฏิบัติการทั่วไปจะใช้น้ำยา polyspecific anti-IgG+C3d ในการตรวจความแรงของแอนติบอดี อาจให้ผลความแรงที่ต่ำกว่าการใช้น้ำยา monospecific anti-IgG แต่ทั้งนี้ อาจไม่มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาโดย Onpuns S และคณะ⁵ พบว่าการตรวจความแรงของ anti-A และ anti-B โดยใช้ anti-IgG cassette เปรียบเทียบกับ polyspecific cassette ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยร้อยละ 45 ให้ผลความแรงของแอนติบอดีเท่ากัน และร้อยละ 55 anti-IgG cassette ให้ผลแรงกว่า polyspecific cassette 1 titer ซึ่งถือเป็นความแรงที่ยอมรับได้ว่าไม่แตกต่างกัน ตามมาตรฐาน AABB²¹

จากการศึกษานี้จะเห็นว่าแอนติบอดีในบางระบบจะให้ผลความแรงโดยเครื่องตรวจอัตโนมัติสูงกว่าหรือต่ำกว่า (ร้อยละ 53 และร้อยละ 20 ตามลำดับ) ซึ่งอาจเกิดจากธรรมชาติของแอนติบอดีและความไวต่อการอ่านผลของเครื่องตรวจอัตโนมัติ ดังนั้นจึงไม่อาจใช้เป็นตัวแทนในระบบหมู่โลหิตอื่นที่ไม่ได้ทำการศึกษา เช่น anti-K เนื่องจากเป็นแอนติบอดีที่พบได้ยากในประชากรคนไทย (พบ antigen K+ = 0.2%²⁴ ซึ่งทำให้โอกาสที่จะพบแอนติบอดีน้อยกว่า 0.2%) ซึ่ง anti-K จัดเป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทาง

คลินิกสูง โดยเฉพาะการเกิดภาวะช็อกจากเม็ดเลือดแดงเป็นแอนติบอดีที่ต้องเฝ้าระวังในหญิงตั้งครรภ์ตามมาตรฐาน British Society for Haematology²⁵ ดังนั้น ในอนาคตควรเพิ่มเติมการศึกษาหาความแรงของ anti-K บนเครื่องตรวจอัตโนมัติ เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถใช้ในการตรวจหาความแรงของแอนติบอดีที่สำคัญทางคลินิกชนิดอื่นต่อไป

สรุป

การศึกษานี้พบว่า การตรวจหาความแรงของแอนติบอดีชนิด IgG โดยวิธี CTT ที่ใช้มาตรฐาน Australian NICE และเครื่องตรวจอัตโนมัติที่ใช้หลักการ CAT ให้ผลการตรวจไม่แตกต่างกัน เมื่ออ่านปฏิบัติการที่ 1+ สุดท้าย และการใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติมีความคงที่ของการทดสอบซ้ำสูง ซึ่งเหมาะสมจะนำมาใช้ในการตรวจในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องตรวจอัตโนมัติใช้ในงานประจำ เพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำ ลดระยะเวลาการทดสอบ จึงสามารถรายงานผลให้แพทย์ได้เร็วขึ้น ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ผู้เชี่ยวชาญพิเศษศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย นางศิริลักษณ์ เพ็ญเจริญ หัวหน้าฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และนางสุนิสา อันนันท์ อติตนักเทคนิคการแพทย์ 8 ฝ่ายธนาคารเลือด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนต้นฉบับ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานห้องปฏิบัติการเม็ดโลหิตแดง ฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วยและทำการตรวจระบุชนิดของแอนติบอดีเบื้องต้นในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ for the Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative and the Transfusion Medicine Resource Committee of the College of American Pathologists. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Vox Sang.* 2008;95:57-65.
2. Adriaansen MJ, Perry HE. Validation of column agglutination technology for blood group alloantibody titration. *NZ J Med Lab Science.* 2013;67:92-6.
3. Adkins BD, Arnold E, gloff SA, Fahey-Ahrndt K, Kjell AL, Cohn CS, Young PP. An exploration of the advantages of automated titration testing: low inter-instrument variability and equivalent accuracy for ABO and non-ABO antibody titres relative to tube testing. *Vox Sang.* 2020;115:314-22.

4. Scientific Subcommittee of the Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion Inc. Guidelines for blood grouping and antibody screening in the antenatal and perinatal setting. 5th ed. Sydney: ANZSBT Secretariat; 2007.
5. Onpuns S, Lorucharoen N, Chongpison Y. Comparative study of ABO antibody titers using conventional tube technique and automated column agglutination technique agglutination technique. *J Hematol Transfus Med.* 2020;30:137-46.
6. Chuansumrit A, Siripoonya P, Nathalang O, Sriphaisal T. The benefit of the direct antiglobulin test using gel technique in ABO hemolytic disease of the newborn. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28:428-31.
7. Thaithumyanon P. Hemolytic disease of the newborn. *J Hematol Transfus Med.* 2000;10:253-7.
8. Samung A, Bejrachandra S, Nathalang O, Plubjuji P, Permpikul P. The detection of IgG maternal alloantibodies for safety transfusion in newborn at Siriraj Hospital. *J Hematol Transfus Med.* 2011;21:5-13.
9. Polacharti P, Somboonvit V, Suwanwiloi C. A first case of haemolytic disease of the newborn due to blood group Rh negative Thai mother. *J Med Assoc Thai.* 1967;50:85-94.
10. Chanachaisuwan P, Chaisangjun L, Jantawaree S, Boribalprasit R, Sangsuk K. A case of Rh(D) hemolytic disease of the newborn at Police General Hospital. *Thai J Hematol Transfus Med.* 2002;12:29-34.
11. Ratanasiri T, Komwilaisak R, Sittivech A, Kleebkeaw P, Secjorn K. Incidence, causes and pregnancy outcomes of hydrops fetalis at Srinagarind Hospital, 1996-2005: a 10-year review. *J Med Assoc Thai.* 2009;92:594-9.
12. Witayathawornwong P. Rh positive infants with Rh negative mothers: a report of 2 cases. *Thai J Pediatr.* 2010;49:73-6.
13. Cheepsattayakorn R, Fongsatitkul L, Chotinaruemol S, Mahawongtong M. Anti-E as a cause of hemolytic disease of the newborn. *J Med Assoc Thai.* 1997;80(suppl.1):s1-4.
14. Witayathawornwong P. Neonatal hyperbilirubinemia due to E antigen of Rh incompatibility: a case report. *Thai J Pediatr.* 2013;52:255-9.
15. Menuam T, Juengpichanvanich N, Charoenkwan P, Sakulwattana M, Cheepsattayakorn R, Fongsatitkul L, et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to antibodies to minor red blood cell groups: two case reports. *Chiang Mai Med J.* 2012;51:119-23.
16. Chiewsilp P, Ratanasirivanich P, Marsh WL, Blank M. Anti-C, anti-e and anti-Ce (rhi) as a cause of hemolytic disease of the newborn in a Thai family. *J Med Assoc Thai.* 1974;57:269-71.
17. Bejrachandra S, Saipin J, Permpikul P. The management of full term pregnant woman with rare antibody: anti-s. Mahidol University Annual Research Abstracts. 2011;39:245-6.
18. Onpuns S, Inthongkam T, Jaipian J, Pruksa C. Anti-PP1Pk: a rare antibody in pregnant women at King Chulalongkorn Memorial Hospital : a case report. *J Hematol Transfus Med.* 2015;25:139-48.
19. Lee CK, Ma ES, Tang M, Lam CC, Lin CK, Chan LC. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy-a review of cases from 1997 to 2001. *Transfus Med.* 2003;13:227-31.
20. Wu KH, Chu SL, Chang JG, Shih MC, Peng CT. Haemolytic disease of the newborn due to maternal irregular antibodies in the Chinese population in Taiwan. *Transfus Med.* 2003;13:311-4.
21. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical Manual. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008.
22. Brown H, Viellez AL, Grey D, Fong E, Caldwell N. Comparison of antibody titration methods across 4 platforms. *Intern Med J.* 2019;49(S5):19-34.
23. Alwar V, Devi AM, Sitalakshmi S, Karuna RK. 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.
24. Rungrong T, Vejbaesya S, Rodpong P, Pimsamsee W, Chongkolwatana V. Red cell phenotyping in blood donors to provide safe blood transfusion for transfused patients at Siriraj Hospital. *J Hematol Transfus Med.* 2018;28:423-30.
25. White J, Qureshi H, Massey E, Needs M, Byrne G, Daniels G, et al. Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfus Med.* 2016;26:246-63.
26. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. The blood group antigen: FactsBook. 3rd ed. Boston: Academic Press; 2012:731-45.