

## นิพนธ์ต้นฉบับ

# การประยุกต์ใช้เทคนิคไมโครเพลทสำหรับตรวจหาชนิดแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดง

อุษณีย์ ชเนตต์มหารมย์<sup>1,2</sup> และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น <sup>2</sup>ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

**บทคัดย่อ** การตรวจหาชนิดแอนติบอดี ด้วยเทคนิคหลอดทดลองมาตรฐานวิธี Indirect antiglobulin standard tube test (IAT-STT) มีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน ต้องการความแม่นยำในการอ่านผลของผู้ทำการทดสอบ หน่วยงานที่มีปริมาณงานมาก อาจรายงานผลการตรวจล่าช้าทำให้มีงานค้าง **วัตถุประสงค์** เพื่อประยุกต์เทคนิคไมโครเพลทสำหรับตรวจหาชนิดแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วย Direct agglutination microplate technique (DAMT) ร่วมกับ Solid phase microplate antiglobulin Test (SPMAT) เพื่อลดขั้นตอน แรงงาน และเวลา **วิธีการศึกษา** เตรียม RBC panel monolayer plate วิธี SPMAT โดยเคลือบเพลทด้วย Panel cells ทดสอบความคงทน ด้วยแอนติบอดีที่ทราบชนิด ทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ นำไมโครเพลทดังกล่าวมาตรวจสอบประสิทธิภาพของเทคนิคไมโครเพลท (DAMT และ SPMAT) ด้วยแอนติบอดีที่ทราบชนิด 40 ตัวอย่าง จากนั้น ตรวจหาชนิดแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่าง เทคนิคไมโครเพลท (DAMT และ SPMAT) กับวิธี IAT-STT ในพลาสมาที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดี ในงานประจำวันของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จำนวน 177 ตัวอย่าง **ผลการศึกษา** พบว่า RBC panel monolayer plate ของวิธี SPMAT มีความคงทนถึง 4 สัปดาห์ และในการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) ด้วยแอนติบอดีที่ทราบชนิด 40 ราย ได้แก่ anti-D 5 ตัวอย่าง anti-E 7 ตัวอย่าง anti-Lewis 13 ตัวอย่าง (anti-Le<sup>a+b</sup> 8 ตัวอย่าง anti-Le<sup>a</sup> 4 ตัวอย่าง anti-Le<sup>b</sup> 1 ตัวอย่าง) anti-M 3 ตัวอย่าง anti-Mi<sup>a</sup> 10 ตัวอย่าง และ anti-P1 2 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจหาชนิดแอนติบอดีได้ถูกต้องทั้งหมด (100%) ส่วนผลการตรวจหาชนิดแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่าง เทคนิคไมโครเพลท (DAMT และ SPMAT) กับวิธี IAT-STT ในตัวอย่าง 177 ตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกัน 174 ตัวอย่าง โดยตรวจพบ anti-D 2 ตัวอย่าง anti-E 15 ตัวอย่าง anti-Le<sup>a</sup> 14 ตัวอย่าง anti-Le<sup>b</sup> 11 ตัวอย่าง anti-Le<sup>a+b</sup> 25 ตัวอย่าง anti-M 10 ตัวอย่าง anti-Mi<sup>a</sup> 66 ตัวอย่าง anti-P1 11 ตัวอย่าง anti-Mi<sup>a</sup>+ anti-E 2 ตัวอย่าง anti-Mi<sup>a</sup>+ anti-Le<sup>a+b</sup> 1 ตัวอย่าง และ unidentified antibodies 17 ตัวอย่าง โดยมี anti-Le<sup>a</sup> 1 ตัวอย่าง และ anti-Le<sup>a+b</sup> 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบด้วยวิธี IAT-STT เพียงวิธีเดียว **สรุป** เทคนิคไมโครเพลท (DAMT และ SPMAT) สามารถตรวจหาชนิดของแอนติบอดีให้ผลสอดคล้องกับ วิธี IAT-STT ถึงร้อยละ 98.13 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจหาชนิดแอนติบอดีทั้ง IgM และ IgG ในหน่วยงานที่มีปริมาณงานสูง

**Keywords :** ● Antibody identification ● Indirect antiglobulin standard tube test ● IAT-STT  
● Solid phase microplate antiglobulin test ● Direct agglutination microplate technique

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2559;26:17-26.

ได้รับต้นฉบับ 20 กรกฎาคม 2558 รับลงตีพิมพ์ 28 ตุลาคม 2558

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถ.มิตรภาพ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

## บทนำ

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 International Society of Blood Transfusion Working Party on blood group system classification<sup>1</sup> ได้จัดหมวดหมู่ของระบบหมู่เลือด โดยอาศัยหลักการ 3 ข้อ คือ

- 1) เรียกชื่อหมู่เลือดตามชื่อของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง
- 2) แอนติเจนนั้นจะต้องทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ human alloantibody
- 3) ต้องพิสูจน์ ชนิด โครงสร้างโมเลกุล และตำแหน่งโครโมโซมของยีนที่ควบคุมการสร้างหมู่เลือดระบบนั้นๆ ได้

ปัจจุบันได้มีรายงานการค้นพบหมู่เลือดแล้วอย่างน้อย 30 ระบบ<sup>2</sup> ประกอบด้วย Major blood group 9 ระบบ ได้แก่ ABO, MNS, P1PK, RH(Rh), Lutheran(LU), Kell(KEL), Lewis (LE), Duffy, Kidd และระบบอื่นๆ อีก ได้แก่ Diego, YT, XG, Sciana(SC), Dombrock(DO) เป็นต้น

หมู่เลือดระบบ ABO เป็นหมู่เลือดที่มีความสำคัญในทุกเชื้อชาติ เนื่องจากเป็นหมู่เลือดระบบเดียวที่นอกจากมี แอนติเจนแล้วยังมี naturally occurring expected antibody หรือ regular antibody<sup>3</sup> ของระบบ ABO ชนิดที่ไม่จำเพาะกับแอนติเจนของระบบ ABO ที่มีอยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง เช่น หมู่เลือด A มีแอนติเจน A และ anti-B หมู่เลือด B มีแอนติเจน B และ anti-A เป็นต้น แอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบอื่น นอกเหนือจากระบบ ABO เป็น unexpected antibodies หรือ irregular antibody<sup>4,6</sup> ที่อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (natural occurring antibody) ด้วยการกระตุ้นของสารคล้ายแอนติเจนของเม็ดเลือดแดง เช่น อาหาร แบคทีเรีย วัคซีนบางชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นแอนติบอดีชนิด IgM ได้แก่ anti-M, anti-N, anti-S, anti-P1, anti-Le<sup>a+b</sup>, anti-Le<sup>a</sup> และ anti-Le<sup>b</sup> เป็นต้น หรือเกิดจากการถูกกระตุ้น (immune antibody) ภายหลังรับเลือด หรือการตั้งครรภ์ ซึ่งเป็นแอนติบอดีชนิด IgG ได้แก่ anti-C, anti-c, anti-D, anti-E, anti-e และ anti-K เป็นต้น

เพื่อความปลอดภัยของผู้ป่วยรับเลือด หรือส่วนประกอบของเลือด จึงต้องตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างของเลือดบริจาคทุกยูนิต และในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยทุกคนและทุกครั้งที่ต้องรับการรักษาด้วยการให้เลือด เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ในพลาสมาของผู้ป่วย วิธีการตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) และการตรวจหาชนิดแอนติบอดี (antibody identification)<sup>4</sup> มีหลายวิธี<sup>6</sup> เช่น standard tube test (STT), column agglutination technique (CAT) และ solid-phase technique เป็นต้น

งานตรวจหมู่โลหิต ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีหน้าที่ตรวจเลือดบริจาค และตัวอย่างเลือดที่โรงพยาบาลต่างๆ ส่งตรวจเฉลี่ย 2,000 รายต่อวัน ประกอบด้วย การตรวจหมู่เลือดระบบ ABO/ Rh (D) โดยใช้หลักการ direct agglutination ด้วยเครื่องตรวจเลือดอัตโนมัติ PK7200, PK7300 (Olympus corporation, Tokyo, Japan) และตรวจกรองแอนติบอดี 3 ขั้นตอนประกอบด้วย room temperature phase ด้วยวิธี STT, enzyme phase ด้วยไมโครเพลท และ solid phase microplate antiglobulin test (SPMAT) และยืนยันผลบวกของการตรวจกรองด้วย indirect antiglobulin test วิธี STT (IAT-STT)<sup>7</sup> และตรวจหาชนิดแอนติบอดี<sup>4,6</sup> ด้วย IAT-STT จากการรวบรวมข้อมูล สถิติการให้บริการประจำวันของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ในปี พ.ศ. 2556 มีตัวอย่างเลือดให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดีประมาณวันละ 80-100 ตัวอย่าง (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่) ที่ต้องนำไปตรวจหาชนิดแอนติบอดีต่อด้วยเทคนิค IAT-STT โดยทดสอบกับ panel cells 11 เซลล์ อ่านปฏิกิริยา 3 ขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจกรองแอนติบอดี ซึ่งต้องใช้ทั้งแรงงาน และเวลาในการทดสอบค่อนข้างมาก ผลการตรวจมีความล่าช้า ส่งผลให้การรายงานผลการตรวจค้างตัวอย่างต่อเนื่อง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประยุกต์เทคนิคไมโครเพลทเพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดแอนติบอดี ประกอบด้วย direct agglutination microplate technique (DAMT) สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ SPMAT สำหรับแอนติบอดีชนิด IgG

## วิธีการศึกษา

### ตัวอย่างทดสอบ

ซีรัมหรือพลาสมาที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดีที่เหลือจากการทดสอบประจำวันของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในช่วงเวลา 2 เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2557 จำนวน 177 ตัวอย่าง

### วิธีการศึกษา

#### การประยุกต์เทคนิคไมโครเพลทสำหรับการตรวจหาชนิดแอนติบอดี

เทคนิคไมโครเพลทที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย

DAMT<sup>8</sup> สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในซีรัมหรือพลาสมากับ 2% panel cells ใน U shape microplate ที่อุณหภูมิห้อง และ SPMAT<sup>11</sup> สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

### 1. การเตรียม Red Blood Cell (RBC) panel monolayer plate สำหรับ SPMAT

ล้างเม็ดเลือดแดงของ panel cells แต่ละรายด้วย 0.9% NSS 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำยา cell fixing buffer (CFB)<sup>10,11</sup> อีก 1 ครั้ง เตรียมเป็น 0.3% RBC panel cells ใน CFB จากนั้นนำ 0.3% RBC panel cells เคลือบใน polystyrene microplate โดยหยด 0.3% RBC panel cells หมายเลข 1 ถึง 11 หลุมละ 50  $\mu$ L นำไปปั่นที่ 450xg (Kubota corporation, Bunk Yo, Tokyo) นาน 2 นาที เม็ดเลือดแดงจะแผ่ในหลุม ปิดไมโครเพลทด้วยแผ่นสติ๊กเกอร์ใสในกล่องพลาสติก (moist chamber) ที่มีฟองน้ำชุบด้วย 0.9% NSS เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 1-6 °C

### 2. การทดสอบ stability ของ RBC panel monolayer plate สำหรับการตรวจด้วย SPMAT

ศึกษาความคงทนของ RBC panel monolayer plate โดยหาความแรง (titer) ของแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบทุก 1 สัปดาห์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แอนติบอดีที่นำมาทดสอบประกอบด้วย anti-D, anti-E, anti-Mi<sup>a</sup>, anti-Le<sup>a+b</sup>, anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Le<sup>a</sup> และ anti-P1 ชนิดละ 1 ตัวอย่าง

### 3. การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค DAMT ร่วมกับ SPMAT

ศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจหาชนิดแอนติบอดีของเทคนิคไมโครเพลท ด้วยแอนติบอดีที่ทราบชนิด ซึ่งได้จากการตรวจในงานประจำวันของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยวิธี IAT-STT จำนวนทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ได้แก่ anti-D จำนวน 5 ตัวอย่าง anti-E จำนวน 7 ตัวอย่าง anti-Lewis จำนวน 13 ตัวอย่าง (anti-Le<sup>a+b</sup> จำนวน 8 ตัวอย่าง anti-Le<sup>a</sup> จำนวน 4 ตัวอย่าง anti-Le<sup>b</sup> จำนวน 1 ตัวอย่าง) anti-M จำนวน 3 ตัวอย่าง anti-Mi<sup>a</sup> จำนวน 10 ตัวอย่าง และ anti-P1 จำนวน 2 ตัวอย่าง

### 4. การตรวจหาชนิดแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค DAMT ร่วมกับ SPMAT และ วิธีมาตรฐาน IAT-STT

ตรวจหาชนิดแอนติบอดีในพลาสมาที่ให้ผลบวกการตรวจกรองแอนติบอดี จากการทดสอบในงานประจำวันของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในช่วงเวลา 2 เดือน ตั้งแต่ตุลาคม ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 จำนวน 177 ตัวอย่าง ด้วยการทดสอบกับ panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ โดยวิธี DAMT มีขั้นตอนดังนี้ คือ หยดพลาสมา 50  $\mu$ L ลงในแต่ละหลุมของ microplate ในแถวบน จำนวน 11 หลุม และหยด 2% panel cells 25  $\mu$ L ลงในแต่ละ หลุม panel cells หมายเลข 1-11 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลทความเร็ว 600xg (Kokusan corporation,

Tokyo, Japan) เป็นเวลา 2 นาที เคาะเพลท หรือตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง เคาะเพลท อ่านปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า ดังนี้

**ผลบวก** ปฏิกิริยา agglutination ความแรง 4+, 3+, 2+, 1+ และ weak

4+ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ หลุดเป็นก้อนเดียวน้ำใส

3+ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ และก้อนเล็ก 1-2 ก้อน น้ำใส

2+ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นก้อนเล็กเท่าๆ กัน หลุดเป็นก้อน น้ำใส

1+ เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเป็นเม็ดทรายขนาดเท่าๆ กันน้ำขุ่น

weak เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มเล็กกระจายทั่วหลุม น้ำขุ่น

**ผลลบ 0** ไม่มีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

**การแปลผล** อ่านผลของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกเทียบกับตาราง panel cells เพื่อแปลผลชนิดแอนติบอดี (Table 1 และ Figure 2)

Figure 2 หมายเลข 1-11 แถวบน แสดงถึงลำดับ panel cells ที่ 1 ถึง 11 ส่วนเลข 1-4 ในแนวตั้งแสดงถึงลำดับตัวอย่างตรวจ เช่น ในตัวอย่างตรวจที่ 1, 2, 4 มีปฏิกิริยา agglutination กับ panel cells หมายเลข 2, 4, 6 เมื่อเทียบกับตาราง panel cells lot.57080 (Table 1) แปลผลได้เป็น anti-Mi<sup>a</sup> และในตัวอย่างที่ 3 คือ anti-Le<sup>a</sup> เป็นต้น

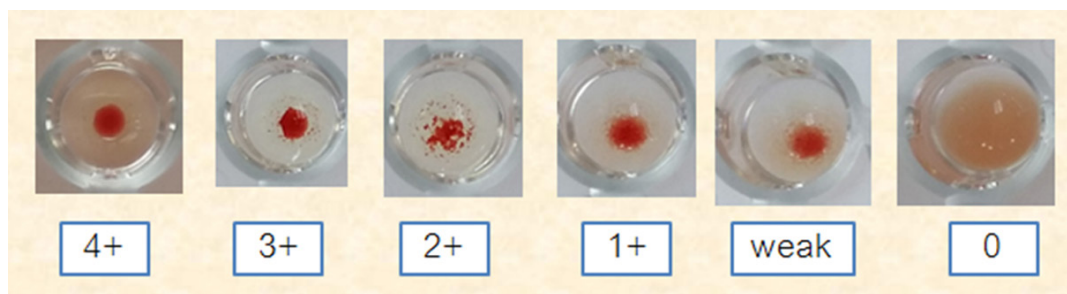
สำหรับวิธีตรวจหาชนิดแอนติบอดีด้วย SPMAT มีขั้นตอนดังนี้ นำ RBC panel monolayer plate ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS 7.2 หยด low ionic strength solution (LISS) และตัวอย่างตรวจ อย่างละ 100  $\mu$ L ลงในหลุมของแต่ละแถว ของ RBC panel monolayer หมายเลข 1 ถึง 11 ของ microplate ซึ่งแต่ละ RBC panel monolayer plate 1 plate สามารถตรวจหาชนิดแอนติบอดีได้ 8 ตัวอย่าง จากนั้น incubate ที่ 37°C นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำ RBC panel monolayer plate ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS โดยเครื่อง semi-automatic microplate washer (Bio-tek Inc, Winooski, VT, USA) หรือล้าง 5 ครั้งด้วย PBS โดยใช้ multichannel pipette แล้วหยด AHG reagent 100  $\mu$ L และ 0.2 indicator cells (O cells ที่เคลือบด้วย anti-D IgG) 50  $\mu$ L ปั่น RBC panel monolayer plate ที่ 600xg นาน 2 นาที

อ่านผลปฏิกิริยาดำเนินการตามแสงไฟ (illuminated surface) Positive (ผลบวก) พบว่า indicator cells จับกับ AHG

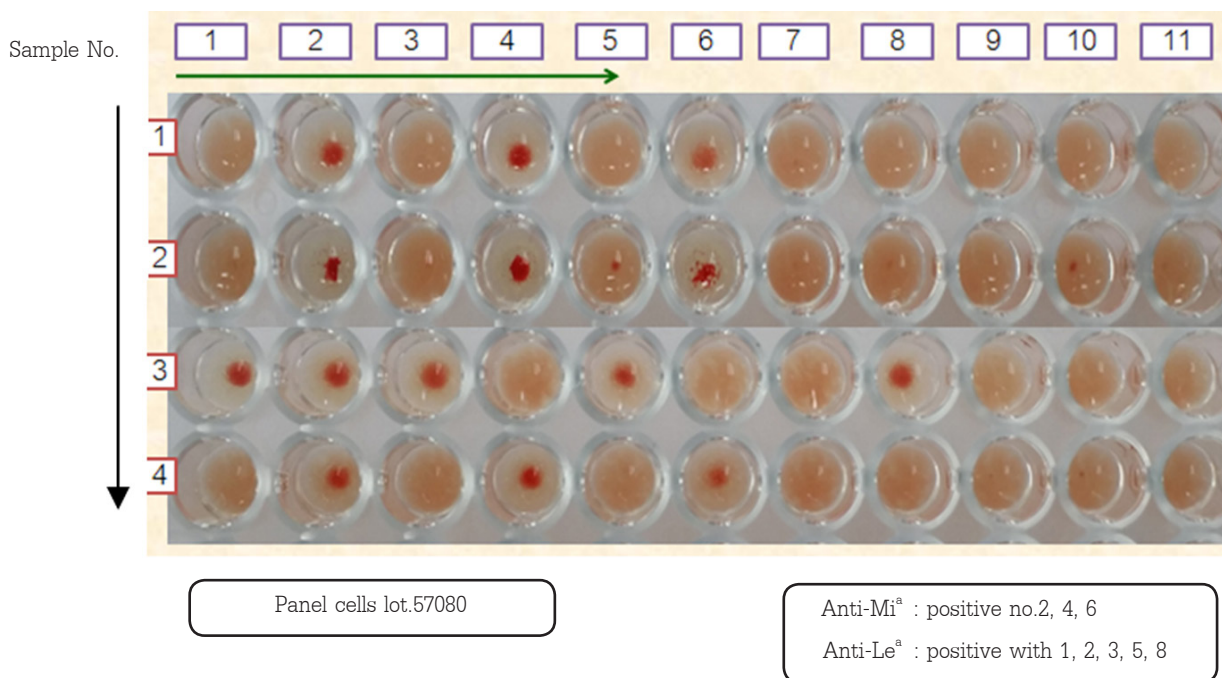
**Table 1** Panel cells\* for antibody identification

| No. | Donor      | Rh               | Rh |   |   |   |   | MNSs |   |   |   | P  | Lewis           |                 | Mi <sup>a</sup> | Kidd            |                 | Duffy           |                 | Kell |   | Diego           |                 | Xg |
|-----|------------|------------------|----|---|---|---|---|------|---|---|---|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|---|-----------------|-----------------|----|
|     | No.        |                  | D  | C | E | c | e | M    | N | S | s | Pl | Le <sup>a</sup> | Le <sup>b</sup> |                 | Jk <sup>a</sup> | Jk <sup>b</sup> | Fy <sup>a</sup> | Fy <sup>b</sup> | K    | k | Di <sup>a</sup> | Di <sup>b</sup> |    |
| 1   | 1002102314 | R1R1             | +  | + | 0 | 0 | + | 0    | + | 0 | + | 0  | +               | 0               | 0               | 0               | +               | +               | 0               | 0    | + | 0               | +               |    |
| 2   | 1004451870 | R1R1             | +  | + | 0 | 0 | + | +    | 0 | 0 | + | 0  | +               | 0               | +               | 0               | +               | +               | 0               | 0    | + | +               | +               | +  |
| 3   | 1003727695 | R1R1             | +  | + | 0 | 0 | + | +    | 0 | 0 | + | 0  | +               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | 0               | 0    | + | +               | +               |    |
| 4   | 1002911317 | R1R1             | +  | + | 0 | 0 | + | +    | 0 | 0 | + | 0  | 0               | +               | +               | +               | 0               | +               | 0               | +    | + | 0               | +               | +  |
| 5   | 1002201799 | R1r              | +  | + | 0 | + | + | 0    | + | 0 | + | 0  | +               | 0               | 0               | +               | +               | +               | +               | 0    | + | 0               | +               |    |
| 6   | 1002502772 | R1R2             | +  | + | + | + | + | +    | 0 | + | + | 0  | 0               | +               | +               | +               | +               | 0               | 0               | +    | 0 |                 |                 |    |
| 7   | 1005347364 | R2R2             | +  | 0 | + | + | 0 | +    | + | 0 | + | +  | 0               | +               | 0               | +               | 0               | 0               | +               | 0    | + | 0               |                 |    |
| 8   | 1003557862 | R2R2             | +  | 0 | + | + | 0 | +    | + | 0 | + | 0  | +               | 0               | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0    | + | 0               |                 |    |
| 9   | 1004039777 | rr               | 0  | 0 | 0 | + | + | +    | 0 | 0 | + | +  | 0               | 0               | 0               | +               | +               | +               | 0               | 0    | + | 0               |                 | +  |
| 10  | 1004923963 | r'r              | 0  | + | 0 | + | + | +    | + | + | + | +  | 0               | 0               | 0               | +               | +               | +               | +               | 0    | + | +               | +               | w  |
| 11  | 1002634129 | r'r <sup>a</sup> | 0  | + | + | + | + | +    | 0 | + | + | +  | 0               | 0               | 0               | +               | 0               | +               | 0               | 0    | + | +               | +               | +  |

\*Panel cells Lot Number 57080 Exp. 13 Sep 2014 (Product of National Blood Centre)

**Figure 1** ความแรงของปฏิกิริยา agglutination เทคนิค DAMT

Panel cells No. 1-11

**Figure 2** การแปลผลชนิดแอนติบอดีที่ได้จากการตรวจด้วยเทคนิค DAMT



และ panel cells ที่เคลือบ แผ่กระจายในหลุม ระดับความแรง 4+, 3+, 2+, 1+, weak (Figure 3)

4+ indicator cells แผ่กระจายทั่วหลุมแสดงผลการทำปฏิกิริยาแรงมาก

3+ indicator cells แผ่กระจายไม่ทั่วหลุมน้อยกว่า 4+

2+ indicator cells แผ่บางส่วน และบางส่วนตกเป็นเม็ดกระดุม

1+ indicator cells แผ่น้อยมาก ส่วนใหญ่ตกเป็นเม็ดกระดุม

Weakly positive (w+) indicator cells ตกเป็นเม็ดกระดุม แต่ขอบไม่เรียบ

Negative (ผลลบ) indicator cells จับกลุ่มกันเองโดยไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดที่เคลือบเพลท ตกเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมขอบเรียบ

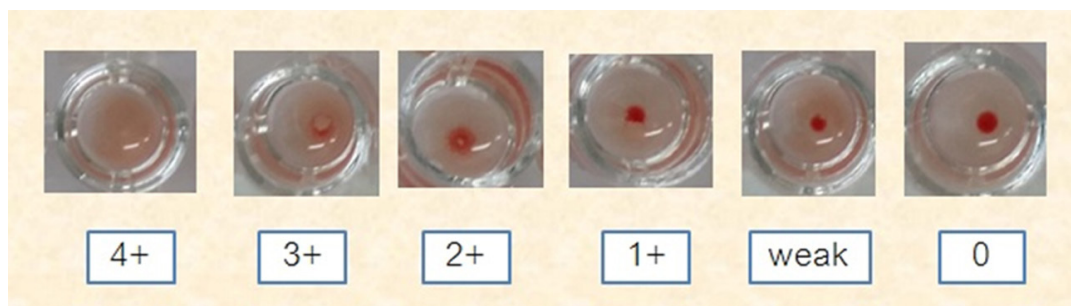
**การแปลผล** แปลผลการทดสอบที่ได้ กับตาราง panel cells (Table 1 และ Figure 4)

ใน Figure 4 ตัวอย่างตรวจหมายเลข 1 และ 2 ให้ปฏิกิริยาผลบวก กับ panel cells หมายเลข 2, 4 และ 6 เมื่อเทียบตาราง panel cells lot.57080 (Table 1) แปลผลได้เป็น anti-Mi<sup>a</sup> และในตัวอย่างที่ 3 ให้ปฏิกิริยาผลบวกกับ panel cells หมายเลข 6, 7, 8 และ 11 แปลผลได้เป็น anti-E เป็นต้น

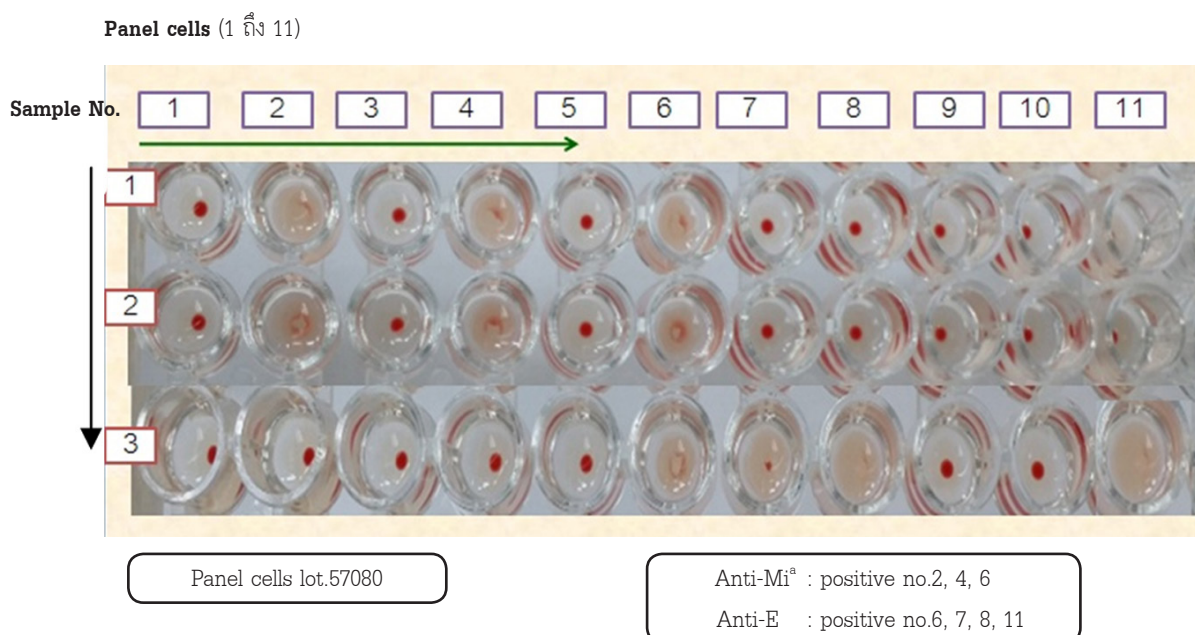
การตรวจยืนยันความถูกต้องของชนิดแอนติบอดี ตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงผู้บริจาคที่ตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมหรือพลาสมา โดยนำเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับ known antiserum ที่จำเพาะกับแอนติบอดีที่ตรวจพบซึ่งจะต้องให้ผลลบเสมอทุกราย โดยทดสอบควบคู่กับ negative และ positive red cell controls

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา คำนวณผลการศึกษาคือเป็นค่าร้อยละ และเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างวิธีไมโครเพลท (DAMT/SPMAT) กับ IAT-STT ด้วย t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กำหนดค่านัยสำคัญที่ค่า p น้อยกว่า 0.05



**Figure 3** ปฏิกิริยาความแรงของ indicator cells กับ AHG และ panel cells ที่เคลือบหลุมเพลทสำหรับการทดสอบวิธี SPMAT



**Figure 4** การแปลผลชนิดแอนติบอดีที่ได้จากตรวจด้วยเทคนิค SPMAT

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICH GCP) ให้ไว้ ณ วันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2557 ลำดับที่: 3.4.01:31/2557 เลขที่: HE572210

### ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความคงทน (stability) ของ RBC panel monolayer coated plate พบว่า RBC panel monolayer plate มีความคงทนได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยผลทดสอบ anti-D, anti-E, anti-Mi<sup>a</sup> มีความแรงมากกว่า 128 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึง สัปดาห์ที่ 5 ส่วน anti-Le<sup>a+b</sup> มีค่าความแรงเท่ากับ 4 ในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 4 และความแรงลดลงมาเป็น 2 ในสัปดาห์ที่ 5 และ anti-Jk<sup>a</sup>, anti-Le<sup>a</sup>, anti-P1 ความแรงเท่ากับ 1 หรือ undiluted ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 5 (Table 2)

ผลการทดสอบหาประสิทธิภาพของเทคนิคไมโครเพลท (DAMT และ SPMAT) กับแอนติบอดีที่ทราบชนิด จากวิธี IAT-STT จำนวนทั้งหมด 40 ราย ปรากฏว่า แอนติบอดีที่ตรวจพบด้วย DAMT วิธีเดียวประกอบด้วย anti-M 2 ตัวอย่าง anti-P1 2 ตัวอย่าง anti-Le<sup>a</sup> 4 ตัวอย่าง anti-Le<sup>b</sup> 1 ตัวอย่าง และ anti-Le<sup>a+b</sup> 8 ตัวอย่าง SPMAT เป็นวิธีเดียวที่ตรวจพบ anti-D และ anti-E ได้ถูกต้องทั้งหมดจำนวน 5 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ DAMT และ SPMAT ให้ผลการตรวจสอบสอดคล้องกัน โดยตรวจพบ anti-M จำนวน 1 ตัวอย่าง และ anti-Mi<sup>a</sup> ทั้ง 10 ตัวอย่าง โดยสรุป เทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) และ IAT-STT ให้ผลการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีสอดคล้องกันทั้ง 40 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 ดังปรากฏใน Table 3

Table 4 แสดงผลการตรวจหาชนิดแอนติบอดีระหว่างเทคนิคไมโครเพลท (DAMTร่วมกับ SPMAT) และวิธี IAT-STT ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 174/177 ราย โดยมีแอนติบอดี 3 ตัวอย่างที่ตรวจพบด้วยวิธี IAT-STT เท่านั้น คือ anti-Le<sup>a</sup> จำนวน 1 ราย และ anti-Le<sup>a+b</sup> จำนวน 2 ราย

**Table 2** Stability of RBC panel monolayer coated plate with known antibody

| Antibody Specificities | Antibody titer tested in different weeks |       |       |       |       |       |
|------------------------|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                        | 0                                        | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Anti-D                 | > 128                                    | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 |
| Anti-E                 | > 128                                    | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 |
| Anti-Mi <sup>a</sup>   | > 128                                    | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 |
| Anti-Le <sup>a+b</sup> | 4                                        | 4     | 4     | 4     | 4     | 2     |
| Anti-Jk <sup>a</sup>   | 1                                        | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Anti-Le <sup>a</sup>   | 1                                        | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Anti-P1                | 1                                        | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |

1 = Undiluted

**Table 3** Efficacy of combined microplate technique for identification of known different antibodies

| Antibody Specificities | Number    | Microplate technique |             |              | Agreement           |
|------------------------|-----------|----------------------|-------------|--------------|---------------------|
|                        |           | DAMT+ only           | SPMAT+ only | DAMT+ SPMAT+ |                     |
| Anti-D                 | 5         | 0                    | 5           | 0            | 5/5                 |
| Anti-E                 | 7         | 0                    | 7           | 0            | 7/7                 |
| Anti-M                 | 3         | 2                    | 0           | 1            | 3/3                 |
| Anti-Mi <sup>a</sup>   | 10        | 0                    | 0           | 10           | 10/10               |
| Anti-P1                | 2         | 2                    | 0           | 0            | 2/2                 |
| Anti-Le <sup>a</sup>   | 4         | 4                    | 0           | 0            | 4/4                 |
| Anti-Le <sup>b</sup>   | 1         | 1                    | 0           | 0            | 1/1                 |
| Anti-Le <sup>a+b</sup> | 8         | 8                    | 0           | 0            | 8/8                 |
| <b>Total</b>           | <b>40</b> | <b>17</b>            | <b>12</b>   | <b>11</b>    | <b>40/40 (100%)</b> |

**Table 4** Antibody specificity identified by combined microplate technique and indirect antiglobulin standard tube test (IAT-STT)

| Antibody specificities                        | Number     | Microplate(+) | Microplate(-) | Microplate(+) |
|-----------------------------------------------|------------|---------------|---------------|---------------|
|                                               |            | IAT-STT(+)    | IAT-STT(+)    | IAT-STT(-)    |
| Anti-P1                                       | 11         | 11            | 0             | 0             |
| Anti-Le <sup>a</sup>                          | 15         | 14            | 1             | 0             |
| Anti-Le <sup>b</sup>                          | 11         | 11            | 0             | 0             |
| Anti-Le <sup>a+b</sup>                        | 27         | 25            | 2             | 0             |
| Anti-M                                        | 10         | 10            | 0             | 0             |
| Anti-Mi <sup>a</sup>                          | 66         | 66            | 0             | 0             |
| Anti-D                                        | 2          | 2             | 0             | 0             |
| Anti-E                                        | 15         | 15            | 0             | 0             |
| Anti-Mi <sup>a</sup> + Anti-E                 | 2          | 2             | 0             | 0             |
| Anti-Mi <sup>a</sup> + Anti-Le <sup>a+b</sup> | 1          | 1             | 0             | 0             |
| Unidentified Ab                               | 17         | 17            | 0             | 0             |
| <b>Total</b>                                  | <b>177</b> | <b>174</b>    | <b>3</b>      | <b>0</b>      |

เมื่อวิเคราะห์เฉพาะจำนวนตัวอย่างที่บอกชนิดของแอนติบอดีได้ เปรียบเทียบระหว่างเทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) และ IAT-STT เทคนิคไมโครเพลทสามารถตรวจหาชนิดแอนติบอดีได้ ร้อยละ 98.13 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p > 0.05$

### วิจารณ์

การเตรียม RBC panel monolayer plate สำหรับเทคนิคไมโครเพลท SPMAT ในการศึกษานี้ใช้เทคนิคของทัศนีย สกุลดำรงคพานิช และคณะ<sup>11</sup> ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจกรองแอนติบอดีแต่งงานวิจัยนี้ประยุกต์การเคลือบเพลทด้วย panel cells เพื่อใช้ตรวจหาชนิดแอนติบอดี จึงต้องระมัดระวังการสลับเซลล์ ในทุกขั้นตอนการเตรียม รวมถึงขณะดูดเซลล์เพื่อเคลือบเพลท ปริมาณความแรงของการดูด ปลอ่ย เซลล์ และไม่ให้เกิดการระเหยของสารละลาย การเก็บรักษา RBC panel monolayer plate ต้องเก็บใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 1-6 °C

การเตรียมและทดสอบด้วยเทคนิคไมโครเพลท SPMAT ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ ได้แก่ เครื่องปั่นไมโครเพลท เครื่องล้างไมโครเพลท ในหน่วยงานที่ไม่มีอุปกรณ์ดังกล่าวจะไม่สามารถทดสอบได้ แต่สำหรับเทคนิคไมโครเพลท DAMT ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือที่จำเพาะ เนื่องจากสามารถอ่านผลด้วยการเคาะเพลท หลังจากตั้งเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหาชนิดแอนติบอดี IgM เท่านั้น ในการตรวจหาชนิดแอนติบอดีสำหรับเทคนิคไมโครเพลทแต่ละครั้งเพื่อความคุ้มค่า

ต้องใช้ตรวจตัวอย่างให้ครบ 8 ราย ใน 1 เพลท ดังนั้นวิธีไมโครเพลทนี้จึงเหมาะสมกับหน่วยงานที่มีปริมาณงานมาก

การศึกษาความคงทนหรืออายุการใช้งานของ RBC panel monolayer plate สำหรับเทคนิคไมโครเพลท SPMAT ในการทดสอบนี้ใช้เวลาทดสอบ 5 สัปดาห์ เพราะอายุของผลิตภัณฑ์เซลล์ใน Alsever's solution มีอายุ 30 วัน นับรวมวันเจาะเก็บมีอายุ 40 วัน<sup>12</sup> ถ้าทดสอบเมื่อเก็บไว้นาน 5 สัปดาห์ แอนติเจนของหมู่เลือดอาจเสื่อมหรือมีความแรงลดลงได้ สำหรับแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบความคงทน RBC panel monolayer plate เป็นแอนติบอดีที่ตรวจพบในงานประจำวัน นำมาตรวจหาความแรงสูงสุดที่ 128 ซึ่งพอดีกับจำนวนที่สามารถตรวจพร้อมกันได้ 1 เพลท (undiluted, 2, 4, 8, 16, 32, 64 และ 128)

เทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) ให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจหาชนิดแอนติบอดีที่ทราบชนิดได้ร้อยละ 100 แต่เมื่อตรวจหาชนิดแอนติบอดีในพลาสมาที่ให้ผลบวกการตรวจกรองแอนติบอดีระหว่างเทคนิคไมโครเพลท และ IAT-STT เทคนิคไมโครเพลทไม่สามารถตรวจหา Lewis antibodies บางตัวอย่าง ซึ่งมีความแรงของแอนติบอดีต่ำ ซึ่มีหรือพลาสมาที่มีแอนติบอดีอ่อนมากปฏิกิริยาเกาะกลุ่มให้เห็นด้วยตาเปล่าอาจอ่อนมาก ทำให้แปลผลเป็นลบ ซึ่งวิธี IAT-STT อ่านผลปฏิกิริยาเกาะกลุ่มที่อุณหภูมิห้องด้วยตาเปล่าและ AHG ด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาจต้องนำตัวอย่างดังกล่าวจาก DAMT มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อทวนซ้ำอีกครั้ง แต่ผู้วิจัยมีได้ทดสอบ จึงเป็นข้อจำกัดในการตรวจหา anti-Lewis และ anti-P1 บางตัวอย่าง

จึงควรเลือกใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย โดยพิจารณาจากเทคนิคการตรวจกรองที่ตรวจพบแอนติบอดีชนิดนั้น เช่น enzyme technique<sup>4,7</sup> เป็นต้น

Finck RH และคณะ<sup>13</sup> ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหาชนิดแอนติบอดีใน eluate จากเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี automated solid-phase red cell adherence (SPRCA) กับวิธี manual gel microcolumn ทั้ง 2 วิธี สามารถหาชนิดแอนติบอดีใน eluate จาก peripheral blood และ cord blood ได้ใกล้เคียงกัน แต่ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์เทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) สำหรับตรวจหาชนิดแอนติบอดีได้ทั้งแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ซึ่ง SPRCA สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้เฉพาะแอนติบอดีชนิด IgG เท่านั้น ทั้งนี้งานวิจัยนี้ไม่ได้ทดสอบเทียบกับ gel test เนื่องจากค่าใช้จ่ายสูงและเคยมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง IAT-STT กับ gel test แล้วในปี พ.ศ. 2556 ศจิกา ปลั่งกลาง และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ<sup>14</sup> ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตโรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่างวิธี STT และ Gel test ในตัวอย่างผู้บริจาค พบวิธี STT มีความไวสูงกว่า DG Gel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.0006$ ) ในปี พ.ศ. 2556 กัญญา ดาวลี และยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ<sup>15</sup> ศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างผู้ป่วยรับโลหิต ระหว่างวิธี STT และ Gel test ในผู้ป่วย พบวิธี STT มีความไวสูงกว่า DG Gel อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) IAT-STT เป็นวิธีมาตรฐานตาม American Association of Blood Bank (AABB) อยู่แล้ว งานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบเทคนิคไมโครเพลท (DAMT ร่วมกับ SPMAT) เทียบกับ IAT-STT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามยังไม่มีเทคนิคการทดสอบใดเพียงวิธีเดียวที่จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีของหมู่เลือดต่างๆ ได้ทั้งหมด

### สรุป

เทคนิคไมโครเพลท ทั้ง DAMT และ SPMAT สามารถตรวจหาชนิดของแอนติบอดีให้ผลสอดคล้องกับ วิธี IAT-STT ถึง 98.13% โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับตรวจหาชนิดแอนติบอดีทั้ง IgM และ IgG ในหน่วยงานที่มีปริมาณงานมาก แต่เทคนิคไมโครเพลท SPMAT มีข้อจำกัดในการตรวจหา anti-Lewis และ anti-P1 บางตัวอย่างที่มีความแรงน้อย จึงควรเลือกใช้เทคนิคอื่นร่วมด้วย โดยพิจารณาจากเทคนิคการตรวจกรองที่ตรวจพบแอนติบอดีชนิดนั้น

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ แพทย์หญิงสร้อยอังกค์ พิกุลสด ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่อนุญาตให้ทำการศึกษาในครั้งนี้ อาจารย์ทัศนีย์ สกุลดำรงคพานิช รองผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่สนับสนุนและให้คำแนะนำในการศึกษา คุณสินีนาฏ อุทา หัวหน้าฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ซึ่งให้อุปกรณ์และความช่วยเหลือ คุณอุดม ตั้งด้อย หัวหน้าฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่น้ำยา ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ และคุณดุขย ภูริกุล ผู้ชำนาญการนักเทคนิคการแพทย์ 6 ช่วยเหลือแนะนำในการเตรียมไมโครเพลท SPMAT

### เอกสารอ้างอิง

1. Smart E, Armstrong B. Blood group systems. In: Armstrong B, Hardwick J, Raman L, Smart E, Wilkinson R, eds. *ISBT Science Series* 2008;3:68-76.
2. ISBT. (2013). *Blood Group Terminology*. Available from: <http://www.isbtweb.org/>, cited 2013 Feb 16.
3. Saipin J. Blood group antigens and antibodies. *Thai J Hematol Transf Med* 2008;18:3-5.
4. Walker PS. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. *Technical manual*. 17<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: AABB 2011:463-96.
5. Caruccio L. Fundamentals of immunology for blood bankers. In: Harmening DM, eds. *Modern Blood banking and Transfusion Practices*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: F.A. Davis Company 2005:58-60.
6. Downes KA, Shulman IA. Pretransfusion testing. In: Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. *Technical manual*. 17<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: AABB 2011:437-50.
7. Trudell KS. Detection and identification of antibodies. In: Harmening DM, ed. *Modern blood banking and transfusion practices*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia Pennsylvania: F.A. Davis Company 2005:242-63.
8. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. *Technical manual*. 17<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: AABB 2011:877-8.
9. Rachel JM, Sinor LT, Beck ML, Plapp FV. A solid-phase antiglobulin test. *Transfusion Medicine* 1985;25:24-6.
10. 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.
11. Sakuldamrongpanich T, Tubrod J, Mekchay S. Development of a solid phase microplate antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. *Thai J Hematol Transf Med* 2003;13:119-29.



12. Sakuldamrongpanich T. The reagent red cell for preparation of screening cell and panel cells. *Thai J Hematol Transf Med* 2013;2:155.
13. Finck RH, Davis RJ, Teng S, Goldfinger D, Ziman AF, Lu Q, et al. Performance of an automated solid-phase red cell adherence system compared with that of a manual gel microcolumn assay for the identification of antibodies eluted from red blood cells. *Immunohematology* 2011;27:1-5.
14. Plungklang S, Urwijitaroon Y. Unexpected antibodies among blood donors : A study for safe blood transfusion. *Thai J Hematol Transf Med* 2014;24:17-23.
15. Daowsee K, Urwijitaroon Y. Red cell alloantibodies in transfused patients: a study for improvement of transfusion service. *Thai J Hematol Transf Med* 2014;23:269-75.

# Application of Microplate Assay for Red Blood Cell Antibody Identification

Usanee Chanetmahun<sup>1,2</sup> and Yupa Urwijitaroon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University; <sup>2</sup>National Blood Centre, Thai Red Cross Society

## Abstract:

**Background:** Indirect antiglobulin standard tube test (IAT-STT) is the gold standard method for red blood cell (RBC) antibody identification. The IAT-STT requires three-time washing step for each reaction tube and well-trained personnel of correct result reading skill. Therefore, the IAT-STT may not be applicable for a high workload laboratory. **Objective:** The purpose of this study was to apply combined microplate technique including direct agglutination microplate (DAMT) and solid phase microplate antiglobulin test (SPMAT) for identification of IgM and IgG red cell antibodies. **Methods:** Red blood cell panel were coated on microplate for SPMAT. Stability of red cells coated microplate was tested for end point titer reaction with seven different known antibodies once per week for five-week. Efficacy for antibody identification of DAMT and SPMAT was performed by identification of 40 known antibodies including 5, anti-D; 7, anti-E; 3, anti-M; 10, anti-Mi<sup>a</sup>; and 2, anti-P1. The ability of combined microplate assay (DAMT and SPMAT) for antibody identification was evaluated in comparison with IAT-STT in 177 positive antibody screening samples. **Results:** The RBC panel monolayer plate for SPMAT was stable for four weeks. Combined microplate assay demonstrated 100% accuracy for identification of 40 known antibodies. The concordance results between combined microplate assay and IAT-STT were found in 174 of 177 unknown samples, including 2, anti-D; 15, anti-E; 50, Lewis antibodies; 10, anti-M; 66, anti-Mi<sup>a</sup>; 11, anti-P1, 2 anti-Mi<sup>a</sup> + anti-E; 1 anti-Mi<sup>a</sup> + anti-Le<sup>a+b</sup> and 17 unidentified antibodies. Discordance results were found in 3 weak antibody samples of one anti-Le<sup>a</sup> and two anti-Le<sup>a+b</sup> which demonstrated only by IAT-STT. **Conclusion:** The combined microplate assay of DAMT and SPMAT demonstrated comparable results to IAT-STT with no statistical significant difference ( $p > 0.05$ ) to with a sensitivity of 98.13%. This combined microplate assay is an alternative assay for identification of both IgM and IgG antibodies, which is beneficial to implement in high workload cost.

**Keywords :** ● Antibody identification ● Indirect antiglobulin standard tube test ● IAT-STT  
● Solid phase microplate antiglobulin test ● Direct agglutination microplate technique

**J Hematol Transfus Med 2016;26:17-26.**