

การประเมินผลชุดทดสอบ K-Med gel ในการทดสอบหมู่โลหิตและตรวจคัดกรอง แอนติบอดีของเม็ดเลือดแดง

อมรรัตน์ ร่มพญา^{1,2*}, จงกล อรรถชาติ¹, กิพาพร จรุงศิริมณีกุล¹, พูนทรัพย์ ศรีพารา¹,
อรุณรัฐ ร่มพญา^{1,2}, จันทนา พัวไพโรจน์¹

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหรือการแตกของเม็ดเลือดแดง การตรวจปฏิกิริยานี้โดยทั่วไปใช้การทำปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ปัจจุบันได้มีการใช้วิธีเจลในการตรวจสอบ ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบชุด K-Med gel ที่ผลิตขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลองและชุดทดสอบเจลสำเร็จรูปจากต่างประเทศ โดยนำ specific gel มาตรวจหาหมู่เลือด ABO และ Rh(D) ในผู้ป่วยจำนวน 500 ราย ตรวจหาหมู่เลือด Rh(CcDEe) ในผู้บริจาคโลหิตจำนวน 500 ราย ทดสอบความไวของ neutral gel และ antiglobulin gel ในการตรวจหาปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 37°C และใช้ในการตรวจคัดกรองแอนติบอดีในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวน 531 ราย ผลการศึกษาพบว่า K-Med specific gel สามารถตรวจหาหมู่โลหิต ABO และ Rh(CcDEe) ได้ดีเทียบเท่ากับวิธีหลอดทดลอง โดยให้ผลตรงกันทุกราย สำหรับ neutral gel และ antiglobulin gel มีความไวและความสามารถในการตรวจพบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ได้เทียบเท่ากับชุดสำเร็จรูปจากต่างประเทศ แต่ไวกว่าวิธีหลอดทดลอง พบผลบวกในการตรวจคัดกรองแอนติบอดี 33 จาก 531 ตัวอย่าง และเมื่อใช้ตรวจหาชนิดแอนติบอดีพบว่า วิธีเจลสามารถพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้มากกว่าวิธีหลอดทดลอง 3 ตัวอย่าง และวิธีหลอดทดลองตรวจพบแอนติบอดีได้มากกว่าวิธีเจลจำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิก ชุด K-Med gel จึงสามารถนำมาใช้การตรวจหมู่โลหิต ABO และ Rh แทนวิธีหลอดทดลอง ส่วน neutral gel และ antiglobulin gel สามารถนำมาใช้ในการตรวจจับปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เพื่อหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดี และเนื่องจากลักษณะของ K-Med gel สามารถใช้งานในลักษณะของไมโครเพลท จึงสามารถรองรับการตรวจในปริมาณงานมากๆ ได้

คำสำคัญ: เจลเทสต์, การตรวจหมู่โลหิต, การตรวจคัดกรองแอนติบอดี

¹ คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ



Evaluation of K-Med gel in blood grouping and antibody screening tests

Amornrat Romphruk^{1, 2*}, Jongkol Akkhat¹, Thipaporn Jaroonsirimaneekul¹, Poonsup Sripara¹,
Arunrat Romphruk^{1, 2}, Chintana Paupairoj¹

Abstract

Immunohematological procedures are based on the interaction between red cell antigens and specific antibodies. Evidence for the *in vitro* formation of an antigen-antibody reaction is traditionally based on the visualization of agglutinates or the presence of hemolysis. The conventional tube test with an indirect anti-globulin test is considered as the gold standard for detecting hemagglutination. Currently, commercial gel tests are used to detect hemagglutination. We aimed to evaluate our in-house developed gel (K-Med gel) against the conventional tube and commercial gel tests. To evaluate the specific gels, samples from 500 patients were tested for ABO and Rh(D) blood group and samples from 500 donated blood were tested for C, c, D, E and e antigens. The sensitivity of the neutral and antiglobulin gels were tested and compared to the commercial gels and the tube tests. The K-Med gel was used for antibody screening on 531 samples. The K-Med specific gel was able to identify ABO and Rh (CcDEe) blood groups as same results as the tube test did. Similarly, the sensitivity of the neutral and antiglobulin K-Med gel was as good as the commercial gels but higher than the tube method. In antibody screening test, 33 of 531 samples were positive. The gel test was able to detect clinically significant antibodies more frequently than the tube method (3 samples). While the tube method was able to detect non clinical significance antibodies more frequently than the gel test (4 samples). In conclusion, K-Med gel is recommended to be used for ABO and Rh blood grouping instead of using the tube method. The neutral and antiglobulin gel were able to detect the antibody-antigen reaction on red blood cells, especially the clinically significant antibodies. The K-Med gel can be applied for micro-plate system, which makes it easier to perform and less time consuming. It is also therefore suitable for routine testing in high work load laboratories.

Keywords: Gel test, Blood grouping, Antibody screening test

¹ Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine

² The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: arunrant@kku.ac.th)

บทนำ

การตรวจหาปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง เป็นการทดสอบพื้นฐานในห้องปฏิบัติการคลังเลือด เช่น การทดสอบหาหมู่โลหิต ABO, Rh และระบบอื่นๆ การตรวจกรอง unexpected antibody (antibody screening test) การตรวจหาชนิดความจำเพาะของ unexpected antibody (antibody identification) และการทดสอบความเข้ากันได้ของเลือดก่อนเติมให้ผู้ป่วย ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน จะแสดงให้เห็นในรูปของการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง หรือการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งในกรณีหลังต้องมีสารพวกคอมพลีเมนต์ในซีรัมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย แอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงที่พบได้เองตามธรรมชาติส่วนใหญ่มักเป็นแอนติบอดีชนิด IgM (natural antibody) สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาในขั้นตอนอุณหภูมิห้อง ส่วนแอนติบอดีที่เกิดจากร่างกายถูกกระตุ้นมักเป็นชนิด IgG (allo immune antibody) ต้องตรวจสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C และทดสอบต่อในขั้นตอน indirect antiglobulin test (IAT) จึงจะพบผลบวกได้

วิธีการที่ใช้ทั่วไปในการตรวจสอบปฏิกิริยา คือ การทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองในตัวกลางน้ำเกลือ (tube method) ⁽¹⁾ โดยให้เซลล์เม็ดเลือดแดงและซีรัมทำปฏิกิริยากันในหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง ปั่นอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนที่ 1 แล้วอุ่นต่อในอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 30 นาที ปั่นอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนที่ 2 จากนั้นนำไปล้างเอา free antibody ออกให้หมด เติมน้ำยา antihuman globulin (AHG) แล้วทำการปั่นเพื่ออ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เป็นขั้นตอนที่ 3 หากให้ผลของปฏิกิริยาเป็นลบ หรือไม่เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง ต้องนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้ายังไม่พบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอีก ต้องทดสอบคุณภาพของ AHG โดยการเติม Coombs control cells ลงไป แล้วทำการปั่นเพื่ออ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอีกครั้ง ถ้าพบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แสดงว่า AHG มีคุณภาพดี ผลการตรวจเป็นลบจริง แต่ถ้ายังไม่พบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอีก แสดงว่า AHG เสื่อมคุณภาพไปแล้ว ผลการตรวจอาจจะเป็นลบปลอมได้ ต้องทำการทดสอบใหม่โดยใช้ AHG ขวดใหม่ หรือ lot ใหม่ ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทดสอบประการหนึ่ง คือ เทคนิคการปั่นและการเขย่าอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญ และ

ประสบการณ์สูง โดยเฉพาะในปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกอย่างอ่อน นอกจากนี้แล้วกระบวนการล้างเซลล์เพื่อขจัด free antibody ก็มีความสำคัญ คือต้องล้าง free antibody ออกให้หมด โดยไม่ให้แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากะที่ผิวเซลล์หลุดออกไปด้วย

ปี ค.ศ. 1986 Lapierre และคณะ⁽²⁾ ได้พัฒนาเทคนิค gel test ขึ้นมาใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดี-แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง ซึ่งมีหลักการคือใช้ gel เป็นตัวกรองกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ที่เกาะกลุ่มกันจากการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี กล่าวคือหลังจากแอนติบอดีในซีรัมทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงในหลอดเจลแล้ว นำไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยงที่เหมาะสม ถ้ามีปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กลุ่มเซลล์จะค้างอยู่ด้านบนของเจล แต่ถ้าปฏิกิริยาให้ผลลบ คือไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เซลล์จะตกลงสู่ส่วนล่างของหลอด จากนั้นจึงอ่านผลของปฏิกิริยา โดยวิธีนี้จะช่วยลดข้อผิดพลาดจากเทคนิคการเขย่าอ่านผลในวิธีหลอดทดลองได้ นอกจากนี้แล้วการอ่านผลสามารถอ่านซ้ำได้ โดยผู้ปฏิบัติงานหลายคนและหลายครั้ง ข้อดีของเทคนิคนี้อีกประการที่สำคัญ คือ ไม่มีขั้นตอนการล้างเซลล์ก่อนเติมน้ำยาแอนติกลอบูลิน ทำให้ลดข้อผิดพลาดอันเกิดจากแอนติบอดีหลุดจากผิวเซลล์ขณะล้าง และใช้ซีรัมปริมาณน้อยในการทดสอบ จากการศึกษาพบว่าเทคนิคเจลมีความไวเทียบเท่ากับวิธีหลอดทดลอง ⁽³⁻⁸⁾ นอกจากนี้แล้วยังประหยัดเวลาสามารถทดสอบในตัวอย่างจำนวนมากขึ้นได้ ในปัจจุบันมีบริษัทที่ทำการผลิตชุดทดสอบเจลอย่างน้อย 6 บริษัท ผลิตจำหน่ายทั่วโลก ราคาต่อการทดสอบสูงถึง 20-23 บาท เป็นข้อจำกัดในการใช้งานประจำวัน เนื่องจากชุดทดสอบมีราคาแพงกว่าวิธีหลอดทดลอง ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ประมาณ 3-5 บาท คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ผลิต microtube gel test สำหรับตรวจหาปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ทั้ง 3 ประเภท คือ specific gel, neutral gel และ antiglobulin gel เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงและปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีในซีรัมและแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง สำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์การบริการโลหิต ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ ประเมินผลการใช้งานของชุดทดสอบเจลที่ผลิตขึ้นใช้เอง (ซึ่งผู้วิจัยขอเรียกชื่อว่า K-Med gel) เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลองและชุดทดสอบสำเร็จรูปจากต่างประเทศ

วัสดุและวิธีการศึกษา

ตัวอย่างทดสอบ

1. การตรวจหาหมู่เลือด ABO และ Rh(D) จำนวน 500 ราย ได้จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ขอใช้เลือดในงานประจำวันของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งผ่านการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh(D) ด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลองแล้ว

2. การตรวจหาหมู่เลือด Rh(CcDEe) ได้จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจากโลหิตของโรงพยาบาลลำปางจำนวน 500 ราย มีเฉพาะแอนติเจน D เท่านั้นที่ผ่านการตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองในงานประจำวันของโรงพยาบาล⁽⁹⁾

3. การตรวจคัดกรองแอนติบอดี ได้จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยที่ขอใช้เลือดในงานประจำวันของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 531 ราย

น้ำยาและอุปกรณ์

ประกอบด้วยเซลล์มาตรฐาน A และ B เข้มข้น 3 % ในน้ำเกลือปกติ เป็นเซลล์ที่ใช้ในงานประจำวันของห้องปฏิบัติการคลังเลือด เซลล์มาตรฐาน screening O cell สำหรับตรวจกรอง unexpected antibody มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ เซลล์ในน้ำเกลือปกติ 2 ชนิด และเซลล์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน 1 ชนิด Monoclonal anti-A และ anti-D (IgG) ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Diaclone® Coombs serum (DiaMed, Switzerland), DG Gel® Coombs and neutral gel (Grifols, Spain), DiaMed® Coombs Gel and neutral gel (DiaMed, Switzerland), DiaMed®, Gel test Centrifuge (Switzerland), Diana®, Gel test Centrifuge (Grifols, Spain), Centrifuge, Sorvall®, Thermo Scientific (USA) และ ชุดทดสอบ K-Med gel ชนิด Neutral gel, antiglobulin gel และ specific gel

วิธีการศึกษา

1. การใช้ K-Med gel สำหรับตรวจหาหมู่เลือดระบบ ABO และ Rh(D) typing

K-Med gel ที่ใช้ในการตรวจหาหมู่เลือดระบบ ABO และ Rh(D) typing มีลักษณะเป็น microtube gel 6 หลุม โดย 4 หลุมแรกจะมีแอนติบอดีที่ทราบชนิดอยู่ในหลอดเจล ได้แก่ anti-A, anti-B, anti-A1 และ anti-D อีก 2 หลุมเป็น

neutral gel สำหรับทดสอบ serum grouping ได้ทำการตรวจหาแอนติเจนบนเซลล์ (ABO cell grouping and Rh(D) typing) โดยใช้เซลล์เข้มข้นที่ 1-1.5 % ในน้ำเกลือ ปริมาตร 50 µl เติมนลงในหลอดเจล และตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม (serum grouping) โดยใช้ซีรัม 50 µl ทำปฏิกิริยากับ 25 µl ของเซลล์มาตรฐาน A และ B ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 900 rpm (135 x g) นาน 6 นาที ทดสอบตัวอย่างเลือดทั้งหมดจำนวน 500 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างได้รับการตรวจโดยวิธีหลอดทดลอง และโดย K-Med gel เป็นแบบปกปิด (blind test)

2. การใช้ K-Med gel สำหรับตรวจหาหมู่เลือดระบบ Rh (CcDEe)

K-Med gel ที่ใช้ในการตรวจหาหมู่เลือดระบบ Rh (CcDEe) มีลักษณะเป็น microtube gel 6 หลุม โดยแต่ละหลุมจะมีแอนติบอดีที่ทราบชนิดอยู่ในหลอดเจล ได้แก่ anti-C, anti-c, anti-D, anti-E, anti-e และ neutral gel ทำการตรวจสอบโดยเตรียมเซลล์เข้มข้นที่ 1-1.5 % ในน้ำเกลือ ปริมาตร 50 µl เติมนลงในหลอดเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 900 rpm (135 x g) นาน 6 นาที

3. การใช้ K-Med gel ชนิด neutral gel ในการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดี-แอนติเจน บนเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิห้อง

Neutral gel เป็นเจลที่ใช้ในการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดี-แอนติเจน ชนิดที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (IgM) หรือใช้ในเทคนิคเอนไซม์ การทดสอบ K-Med gel ครั้งนี้เพื่อดูความไวในการตรวจหาปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง เปรียบเทียบกับ DiaMed, DG gel และวิธีหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์มาตรฐาน A ทดสอบกับ anti-A ชนิด IgM ที่อัตราเจือจางต่างๆ (1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600, 1:3,200 และ 1:6,400 ตามลำดับ) โดยใช้ เซลล์เข้มข้นที่ 3 % ในน้ำเกลือ 25 µl ทดสอบกับซีรัมเจือจาง 50 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงปั่นอ่านผล สำหรับวิธีหลอดทดลองจะใช้ปริมาณเซลล์และซีรัมเพิ่มเป็น 2 เท่า ทำตามการทดสอบแบบ conventional tube test⁽¹⁾ ทุกวิธีทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในเวลาที่ต่างกัน และเป็นการทดสอบแบบปกปิด

4. การใช้ K-Med gel ชนิด antiglobulin gel ในการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดี-แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงในขั้นตอน antiglobulin phase

Antiglobulin gel เป็นเจลที่มีน้ำยา antiglobulin อยู่ในเจล ใช้ในการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดีชนิดที่ทำ

ปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิร่างกาย หรือ 37 °ซ (IgG) การทดสอบ K-Med gel ครั้งนี้เพื่อดูความไวในการตรวจหาปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง เปรียบเทียบกับ DiaMed, DG gel และ วิธีหลอดทดลอง การทดสอบโดยเทคนิค saline antiglobulin test ใช้เซลล์เข้มข้น 3 % ในน้ำเกลือปริมาตร 25 µl ทดสอบกับ anti-D ชนิด IgG ที่อัตราการเจือจางต่างๆ ปริมาตร 50 µl ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที ส่วนเทคนิค low ionic strength solution (LISS) antiglobulin test ใช้เซลล์เข้มข้น 1% ใน LISS ปริมาตร 50 µl ทดสอบกับ anti-D เจือจาง 25 µl ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 15 นาที กรณีวิธีหลอดทดลองจะใช้ปริมาตรเซลล์และซีรัมเพิ่มเป็น 2 เท่า ทั้งหมดทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในเวลาที่ต่างกัน และเป็นการทดสอบแบบปกปิด

5. การใช้ K-Med gel ชนิด neutral gel และ anti-globulin gel ในการทดสอบ การตรวจกรอง unexpected antibody ในซีรัมผู้ป่วย

การตรวจกรองแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยใช้ screening cells 2 ชนิด และ papainized cell 1 ชนิด เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลอง ทำการทดสอบทั้งหมด 531 ตัวอย่าง โดยการทดสอบเป็นแบบปกปิด

5.1 วิธีหลอดทดลอง

เป็นการทดสอบในงานประจำวัน ของห้องปฏิบัติการคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เทคนิค saline ในขั้นตอนอุณหภูมิห้อง และขั้นตอน antiglobulin test และใช้เทคนิคเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในขั้นตอน antiglobulin test⁽¹⁾

5.2 วิธี K-Med gel test

ทดสอบเทคนิค saline ในขั้นตอนอุณหภูมิห้องตรวจหาปฏิกิริยาด้วย neutral gel, ทดสอบโดยเทคนิค LISS ที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจหาปฏิกิริยาด้วย antiglobulin gel และเทคนิคเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจหาปฏิกิริยาด้วย neutral gel

ในกรณีที่การทดสอบ antibody screening ให้ผลบวก จะนำซีรัมนั้นไปตรวจหาชนิดของ unexpected antibody ต่อไป ด้วยเทคนิค saline หรือเอนไซม์ ผลการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีจะจำแนกเป็น 4 กลุ่มคือ

1) พบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก คือ แอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°ซ เช่น anti-C, anti-E, anti-c และ anti-e เป็นต้น

2) พบแอนติบอดีที่ไม่มีมีความสำคัญทางคลินิก คือแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เช่น anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P1 และ anti-Mia เป็นต้น

3) Nonspecific เป็นซีรัมที่ทำปฏิกิริยากับทุก panel cells ซึ่งน่าจะเป็น cold autoantibody ในกรณีนี้รวมปฏิกิริยา rouleaux formationไว้ด้วย

4) ให้ผลลบกับการทดสอบ antibody identification

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาการใช้ K-Med gel เทียบกับวิธีหลอดทดลอง ซึ่งเป็น conventional method และเทียบกับชุดเจลสำเร็จรูปจากต่างประเทศ ในการตรวจหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง และปฏิกิริยาแอนติบอดี-แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงได้ผล ดังนี้

1. ผลการใช้ชุดทดสอบ K-Med specific gel

จากการนำ K-Med specific gel ชนิดตรวจหาแอนติเจนระบบ ABO ได้แก่ตรวจหาแอนติเจน A, B, A1 บนเซลล์ และ serum grouping ได้แก่ตรวจหา anti-A และ anti-B ในซีรัม และตรวจหาแอนติเจน D ทดสอบในตัวอย่างทั้งหมด 500 ราย เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลองพบว่าได้ผลตรงกันทุกราย ดัง ตารางที่ 1 ในตัวอย่างตรวจมี ABO subgroup ทั้งหมด 3 ราย และ แอนติเจน Rh(D) ลบ จำนวน 2 ราย

ตารางที่ 1 ชนิดของหมู่เลือด ABO และ Rh(D) จากตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจำนวน 500 ตัวอย่าง ทดสอบด้วย K-Med gel test และหลอดทดลอง ซึ่งให้ผลตรงกันทั้งหมด

Blood group	number
A ₁ , D+	107
A ₂ B, D+	1
A ₃ , D+	2
A ₁ B, D+	35
B, D+	184
B, D neg	2
O, D+	169
total	500

เมื่อทำการทดสอบหาแอนติเจนระบบ Rh (CcDEe) ในตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 500 ราย⁽⁹⁾ ได้ผลตาม ตารางที่ 2 ทุก รายไม่พบผลบวกปลอมเนื่องจากหลุม neutral gel ให้ผลลบ พบแอนติเจน C-negative 16 ราย แอนติเจน D-negative 2 ราย และ แอนติเจน e-negative 13 ราย ซึ่งในตัวอย่างที่ให้ แอนติเจนลบทั้ง 31 ราย เมื่อทดสอบซ้ำด้วยวิธีหลอดทดลอง ก็ให้ผลลบเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2 การตรวจหาแอนติเจน CcDEe ในเลือดผู้บริจาค โลหิตจำนวน 500 ราย ด้วย K-Med gel

Antigen	Positive		Negative	
	Number	%	Number	%
C	484	96.8	16 *	3.2
c	168	33.6	332	66.4
D	498	99.6	2 *	0.4
E	149	29.8	351	70.2
e	487	97.4	13 *	2.6

* = ตรวจยืนยันด้วยวิธีหลอดทดลองแล้วได้ผลลบ

ตารางที่ 3 การตรวจหาปฏิกิริยาโดย neutral gel ของ K-Med กับชุดเจล DiaMed, DG และวิธีหลอดทดลอง ในการทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

Diluted anti-A	K-Med gel	DiaMed gel	DG gel	หลอดทดลอง
1 : 200	4+	4+	4+	4+
1 : 400	3+	3+	3+	4+
1 : 800	3+	2+	3+	3+
1 : 1,600	2+	1+	1+	2+
1 : 3,200	1+	neg	neg	1+
1 : 6,400	neg	neg	neg	neg
3 % BSA	neg	neg	neg	neg

3. ผลการใช้ชุดทดสอบ K-Med ชนิด antiglobulin gel

จากการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดีชนิด ที่ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิร่างกาย (IgG) โดยใช้ antiglobulin gel ตรวจหาปฏิกิริยาในขั้นตอน indirect antiglobulin test ทดสอบเปรียบเทียบชุด K-Med gel กับชุดเจล DiaMed, DG gel

2. ผลการใช้ชุดทดสอบ K-Med ชนิด neutral gel

จากการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติบอดีชนิดที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (IgM) โดยใช้ K-Med gel ชนิด neutral gel เปรียบเทียบกับชุดเจล DiaMed, DG gel และวิธีหลอดทดลองโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ A ทำปฏิกิริยากับ anti-A ที่อัตราเจือจาง 1:200-1:6,400 ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในเวลาที่ต่างกัน และเป็นการทดสอบแบบปกปิด ได้ผลเหมือนกันดัง ตารางที่ 3 ชุดทดสอบ K-Med gel และวิธีหลอดทดลองสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาได้ถึงอัตราเจือจางที่ 1:3,200 (ปฏิกิริยา 1+ ในหลอดที่ 5) ส่วน DiaMed, DG gel ตรวจสอบปฏิกิริยาได้ถึงอัตราเจือจางที่ 1:1,600 (ปฏิกิริยา 1+ ในหลอดที่ 4) สำหรับตัวอย่างควบคุมผลลบให้ผลลบทุก การทดสอบ เมื่อพิจารณาถึงค่าความแรงของปฏิกิริยาจะเห็นว่า K-Med gel ให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาใกล้เคียงกับวิธีหลอดทดลอง และให้ค่าความแรงของปฏิกิริยามากกว่าชุดเจล สำเร็จรูปทั้ง 2 บริษัท

และวิธีหลอดทดลองโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีแอนติเจน D ทดสอบกับ anti-D ชนิด IgG โดยทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในเวลาที่ต่างกันและเป็นการทดสอบแบบปกปิด ได้ผลเหมือนกัน ดัง ตารางที่ 4 การทดสอบโดยเทคนิค saline พบว่า K-Med gel, DiaMed, DG gel สามารถตรวจพบปฏิกิริยาที่อัตราเจือจาง 1:16,000 ในขณะที่วิธีหลอดทดลอง

ให้ผลบวกที่ 1:8,000 และเมื่อทดสอบในตัวกลาง LISS (ตารางที่ 5) ทุกเจลสามารถตรวจหาปฏิกิริยาได้ถึงอัตราเจือจาง 1:32,000 แต่วิธีหลอดทดลองตรวจหาปฏิกิริยาได้ที่อัตราเจือจาง 1:16,000 ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมผลลบให้ผลลบ

ทุกการทดสอบ การทดสอบในขั้นตอน indirect antiglobulin test ความแรงของปฏิกิริยาในหลอดทดลองจะน้อยกว่าวิธีเจลทั้งเทคนิค saline และ LISS

ตารางที่ 4 การทดสอบปฏิกิริยา indirect antiglobulin test ด้วย saline technique โดยใช้ antiglobulin gel เปรียบเทียบระหว่าง K-Med gel, DiaMed gel, DG gel และวิธีหลอดทดลอง

Diluted anti-D	K-Med gel	DiaMed gel	DG gel	Tube test
1 : 2,000	3+	3+	4+	2+
1 : 4,000	3+	3+	3+	1+
1 : 8,000	1+	1+	3+	Weakly positive
1 : 16,000	1+	1+	1+	neg
1 : 32,000	neg	neg	neg	neg
3 % BSA	neg	neg	neg	neg

ตารางที่ 5 การทดสอบปฏิกิริยา indirect antiglobulin test ด้วย LISS technique โดยใช้ antiglobulin gel เปรียบเทียบระหว่าง K-Med gel, DiaMed gel, DG gel และวิธีหลอดทดลอง

Diluted anti-D	K-Med gel	DiaMed gel	DG gel	Tube test
1 : 4,000	3+	3+	4+	2+
1 : 8,000	2+	3+	3+	2+
1 : 16,000	1+	2+	3+	1+
1 : 32,000	1+	1+	1+	Weakly positive
1 : 64,000	neg	neg	neg	neg
3 % BSA	neg	neg	neg	neg

4. ผลการใช้ K-Med gel ในการตรวจกรอง un-expected antibody ในซีรัมผู้ป่วย

จากการตรวจกรองแอนติบอดี ในซีรัมผู้ป่วย ทั้งหมด 531 ตัวอย่าง ทั้งวิธี K-Med gel test และวิธีหลอดทดลอง พบว่าให้ผลบวกจำนวน 33 ตัวอย่าง มี 3 ตัวอย่างที่มีซีรัมไม่พอทดสอบหาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) จึงไม่นำมาวิเคราะห์ข้อมูล จากตัวอย่าง

ทั้งหมด 30 ตัวอย่างที่สามารถทดสอบหาชนิดของแอนติบอดีแยกเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค saline/LISS จำนวน 18 ตัวอย่าง ผลบวกกับเทคนิคเอนไซม์จำนวน 16 ตัวอย่าง (มี 4 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสองเทคนิค) ให้ผลบวกเฉพาะวิธีหลอดทดลองจำนวน 11 ตัวอย่าง เฉพาะวิธีเจลจำนวน 7 ตัวอย่าง และผลบวกทั้งสองวิธีจำนวน 16 ตัวอย่าง ผลการทดสอบ antibody identification ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ชนิดของ unexpected antibody ในซีรัมผู้ป่วยจำนวน 531 ราย ที่ทดสอบด้วยวิธีหลอดทดลองและวิธีเจล ให้ผลบวกกับเทคนิค Saline/LISS จำนวน 18 ตัวอย่าง และเทคนิคเอนไซม์จำนวน 16 ตัวอย่าง

Antibody identification	Saline/LISS Technique (n = 18)			Enzyme technique (n = 16)		
	Tube +/gel -	Tube -/gel +	Tube +/gel+	Tube +/gel -	Tube -/gel +	Tube +/gel+
	(n = 9)	(n = 1)	(n = 8)	(n = 2)	(n = 6)	(n = 8)
significant ab.	0	0	3 ^a	0	3 ^b	3 ^c
non significant ab.	5	1	4	0	0	0
nonspecific	3	0	1	0	3	5
negative	1	0	0	2	0	0

a = anti-E + anti-c, -E + Mi^a, Mi^a b = anti-E 2 ตัวอย่าง, anti-E + anti-c c = anti-E + anti-c

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของ microtube gel (K-Med gel test) ที่ผลิตขึ้นโดยทีมผู้วิจัยทั้ง 3 ชนิดคือ specific gel, neutral gel และ antiglobulin gel สามารถสรุปได้ว่า specific gel (ABA1D และ CcDEe) มีความสามารถตรวจหาหมู่โลหิต ABO และ Rh(CcDEe) ได้ดีเทียบเท่ากับวิธีหลอดทดลอง ทั้งนี้ในกรณี subgroup A2B ที่พบใน 1 ตัวอย่าง ยังคงให้ผลบวกกับ anti-A แต่ให้ผลลบกับเจลชนิด anti A1 ในกรณี subgroup A3 ให้ปฏิกิริยา mix field กับ anti-A และให้ผลลบกับ anti-A1 สำหรับการให้ K-Med gel ตรวจหาแอนติเจน Rh(D) ปฏิกิริยาของแอนติเจน Rh ลบ (D negative) และแอนติเจน Rh D weak จะตรวจได้ Rh ลบ จากนั้นต้องตรวจยืนยันโดยวิธีหลอดทดลอง เพื่อทดสอบให้ชัดเจนว่าเป็น Rh ลบ หรือ Rh D weak ⁽¹⁰⁾

การตรวจหาปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ neutral gel สรุปได้ว่า K-Med gel มีความไวเทียบเท่ากับวิธีหลอดทดลอง และสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาได้ดีกว่าชุดทดสอบสำเร็จรูปทั้ง 2 บริษัท และเมื่อนำ neutral gel ทดสอบ ABO serum grouping จำนวน 500 ราย จะให้ค่าความแรงของปฏิกิริยาที่ 4+ ถึง 3+ มีเพียง 2 ราย ที่ให้ผลค่อนข้างต่ำที่ 2+ และ 1+ ความหลากหลายของความแรงของปฏิกิริยา พบได้เช่นเดียวกับที่มีรายงานการศึกษามาแล้วทั้งด้วยวิธี column agglutination และวิธีหลอดทดลอง^(11,12) อาจเป็นไปได้ว่าในรายดังกล่าวจะมีแอนติบอดีชนิด isohemagglutination ไม่แรง (ซึ่งอยู่ในระหว่างศึกษาเพิ่มเติม)

การตรวจหาปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในขั้นตอน indirect antiglobulin test โดยใช้ antiglobulin gel ทดสอบปฏิกิริยาของ anti-D ชนิด IgG สรุปได้ว่า K-Med gel มีความไวในการทดสอบเทียบเท่ากับชุดเจลสำเร็จรูป 2 บริษัท และโดยวิธีเจลทั้งหมดจะมีความไวในการตรวจหาปฏิกิริยาได้ดีกว่าวิธีหลอดทดลอง ไม่ว่าจะใช้เทคนิค saline หรือ LISS เมื่อใช้ K-Med gel ในการตรวจกรองแอนติบอดีในผู้ป่วย (antibody screening) เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลอง สามารถสรุปได้ว่าด้วยเทคนิค saline/LISS วิธี K-Med gel ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดีเท่าวิธีหลอดทดลอง พบได้ 3 ราย (ตารางที่ 6) แต่วิธีหลอดทดลองตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกหรือ nonspecific ได้มากกว่าวิธี K-Med gel ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตอนอุณหภูมิห้องได้ดี (non significant antibody) ได้แก่ anti-P1, anti-Le^a, anti-Le^b และ anti-Mi^a และเมื่อใช้เทคนิคเอนไซม์วิธี K-Med gel สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้มากกว่าวิธีหลอดทดลอง 3 ราย โดยทั้ง 3 รายเป็น anti-E/-Ec ชนิดที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิร่างกาย (37°ซ) อย่างไรก็ตาม วิธีเจลก็พบปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ (nonspecific) มากกว่าวิธีหลอดทดลองด้วย ซึ่งปฏิกิริยา nonspecific ในเทคนิคเอนไซม์นี้ พบได้เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อน ⁽¹³⁾

จากการศึกษาด้วยชุดทดสอบ K-Med gel ครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ซึ่งใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจากต่างประเทศ ⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ ที่พบว่าวิธีเจลสามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดีกว่าวิธีหลอดทดลอง ในขณะที่

ที่วิธีหลอดทดลองจะตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกได้มากกว่าวิธีเจล อย่างไรก็ตาม จากการรายงานการศึกษาในการทดสอบ indirect antiglobulin test ไม่ว่าจะใช้เทคนิคหลอดทดลอง, solid phase microplate หรือเจลก็ไม่สามารถใช้เทคนิคใดเพียงเทคนิคหนึ่งในการตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ทั้งหมด^(3, 19,20)

โดยสรุปแล้ว K-Med specific gel สามารถตรวจหาหมู่โลหิต ABO และ Rh(CcDEe) ได้ดีเทียบเท่ากับวิธีหลอดทดลอง สำหรับ neutral gel และ antiglobulin gel มีความไวและความสามารถในการตรวจจับปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ได้เทียบเท่ากับชุดทดสอบเจลสำเร็จรูปจากต่างประเทศ แต่ไวกว่าวิธีหลอดทดลอง ดังนั้นชุดเจลที่พัฒนาขึ้นจึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจหมู่โลหิต ABO และ Rh แทนวิธีหลอดทดลอง ส่วน neutral gel และ antiglobulin gel สามารถนำมาใช้ในการตรวจจับปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในการทดสอบ antibody screening test เพื่อหา clinical significant antibody ได้ดี และเนื่องจากลักษณะของ microtube gel ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้งานในลักษณะของไมโครเพลท รองรับการทดสอบทีละหลายๆ มากถึงครั้งละ 384 การทดสอบ (96 x 4 การทดสอบ) จึงเหมาะกับงานบริการที่มีปริมาณมากเช่น การตรวจเลือดหลังบริจาค (blood processing) ได้อย่างมีประสิทธิภาพกล่าวคือ มีขั้นตอนที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ได้ผลถูกต้อง และประหยัดค่าใช้จ่าย ทำให้งานประจำวันของห้องปฏิบัติการเสร็จได้เร็วยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Method section 3. Antibody detection, antibody identification, and serologic compatibility testing. In: Brecher ME, editor. Technical Manual 15th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks. 2005:p752-60.
2. Lapierre Y, Rigel D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990; 30: 109-13.
3. Bromilow IT, Adams KE, Hope J, Eggington JA, Duguid JKM. Evaluation of the ID-gel test for antibody screening and identification. Transfus Med 1991; 1: 159-61.
4. Bromilow IM, Eggington JA, Owen GA, Duguid JKM. Red cell antibody screening and identification: A comparison of two column technology methods. Br J Biomed Sci 1993; 50: 329-33.
5. Pinkerton PH, Ward J, Chan R, Coovadia AS. An evaluation of a gel technique for antibody screening compared with a conventional tube method. Transfus Med 1993; 3: 201-5.
6. Pinkerton PH, Chan R, Ward J, Coovadia AS. Sensitivity of column agglutination technology in detecting unexpected red cell antibodies. Transfus Med 1993; 3: 275-9.
7. Lamy B, Tissot C, Heyd C, Lamy C. Red cell antibody screening, red cell antibody identification and compatibility testing with the Column agglutination and compatibility testing with the column agglutination technology (CAT). The Bio Vue system Transfus Clin Biol 1994; 1: 121-7.
8. Weisbach V, Zeiner R, Zimmermann R, Glaser A, Zingsem J, Eckstein R. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. Transfusion 1999; 39: 1045-50.
9. ทรงศักดิ์ มีลาภ, การะเวก นนท์เดชกุล. การตรวจหาแอนติเจน D, C, c, E, e ในผู้บริจาคโลหิตจังหวัดลำปาง โดยวิธี K-med เจล. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2549
10. Method section 2. Red cell typing. In: Brecher ME, editor. Technical Manual 15th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks. 2005:p741-2.
11. Langston MM, Procter JL, Cipolone KM, Stroncek DF. Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing. Transfusion 1999; 39: 300-5.
12. มธุรส ชัยวรพร, ศศิธร สารทกลาง, สมศรี แสนยะบุตร, นุชนารถ นนทรี. การศึกษาเพื่อประเมินผลการนำเครื่องอัตโนมัติมาใช้งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาสารคาม. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2552; 3: 3026-36.

13. Geisen C, Klarman D, Sireis W, Seifried E, Bonig H. Antibody screening with papain-treated test erythrocytes detects potentially transfusion-relevant allo-antibodies. *Vox Sanguinis* 2009; 96(supl 1):159.
14. อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, รัชนี โอเจริญ, นงลักษณ์ แสนดอนดู, รัชนี มีสมุทร. การใช้เทคนิค gel สำหรับการตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 2536; 3: 299-306.
15. ศิริมา พงศ์ถิ่นทองงาม. การแยกชนิดของแอนติบอดีโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีเจลและวิธีหลอดทดลอง. *วชิรเวชสาร* 2544; 3: 231-6.
16. ลัดดา ฟองสกลิตกุล, อรุณี ลิ้มทิพย์สุนทร, ปราณี พิสัยพงศ์, นวลชื่น คำทอง. การตรวจกรองและการตรวจหาชนิดของ unexpected antibody ด้วยวิธีเจล. *คำบรรยายการประชุมวิชาการประจำปี พศ. 2546*. หน้า 80.
17. กฤษณา เอื้อน้อมจิตต์กุล. การศึกษาเปรียบเทียบการคัดกรองแอนติบอดีโดยวิธีโพลีบริน, เจลเทสต์, ออโตวิวอินโนวา และวิธีมาตรฐาน. *คำบรรยายการประชุมวิชาการงานบริการโลหิตระดับชาติประจำปี พศ. 2550*. หน้า 233.
18. Kafedzic AP, Ljubuncic G, Samardzic M, Nikic S, Ivankovic Z. Changes observed after switch from tube test to gel microcolumn technique in pretransfusion testing with factors possibly influencing the benefits. *Vox Sanguinis* 2009; 96(supl.1): 169-70.
18. Maynard BA, Smith DS, Farrar RP, Kraetsch RE, Chaplin H. Anti-Jka, -C, and -E in a single patient, initially demonstrable only by the manual hexadimethrine bromide (Polybrene) test, with incompatibilities confirmed by ⁵¹Cr-labeled red cell studies. *Transfusion* 1988; 28: 302-6.
19. Grey D, Connolly M, Erber WN. Comparison of low ionic diluents for use with the Diamed anti-globulin gel test. *Transfus Med* 2002; 12: 63-9.