

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจกรอง Unexpected antibodies ในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหลายครั้งโดยวิธี Microplate Monolayer Technique

พรพิไล อุดมโกษณ์*, สุรภา เศรษฐะ**, ปรียานาถ วงศ์จันทร์**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้พัฒนาและดัดแปลงวิธี microplate monolayer (MMT) เพื่อใช้ตรวจกรอง unexpected antibodies ในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหลายครั้ง โดยเคลือบเพลทด้วย panel cells ให้เป็นชั้นเดียว (monolayer) ด้วย Poly-L-lysine จากนั้นเติมซีรัมที่ต้องการตรวจสอบและตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยการเติม immunoglobulin coated indicator cells ผลการศึกษาสรุปได้ถึงภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคดังกล่าวคือเคลือบเพลทด้วย 0.4% panel cells ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน ความเข้มข้นของ indicator cells ที่เหมาะสมคือ 0.1% absorbed immunoglobulin coated O cells ใน 1%BSA PBS pH 7.2 และเวลาสำหรับปฏิกิริยาคือข้ามคืนในอุณหภูมิห้อง จากการศึกษากลุ่มตัวอย่างซีรัมจำนวน 80 รายจากผู้ป่วยที่เคยได้รับเลือดมากกว่าสองครั้งขึ้นไปด้วยเทคนิคดังกล่าวเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Indirect antiglobulin test (IAT) พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลตรงกัน คือให้ผลบวกจำนวน 3 รายคิดเป็น 3.75% และให้ผลลบ 77 ราย คิดเป็น 96.25% เห็นได้ว่าวิธี MMT สามารถตรวจกรอง unexpected antibodies ได้ดีเช่นเดียวกับวิธีมาตรฐาน IAT ข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งคือสามารถทำได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน นอกจากนี้ยังลดปริมาณ panel cells ที่ใช้ต่อรายรวมถึงช่วยเพิ่มอัตราส่วนของซีรัมต่อเซลล์ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาดีขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบชนิดของแอนติบอดีและใช้งานประจำวันได้อย่างมีประสิทธิภาพ วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2546; 36: 178-184.

คำรหัส: microplate monolayer, multiple transfusions, panel cells, antiglobulin test, poly L-lysine

* นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 พ.ศ. 2544

** ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Screening of Unexpected Antibodies in Patients with Multitransfusion by Microplate Monolayer Technique

Pornpilai Udompote*, Surapa Decha**, Preeyanat Vongchan**

In this study, microplate monolayer technique (MMT) was developed and applied for unexpected antibody screening in serum of patients with multiple transfusions. The principle was to perform the monolayer panel cells by using the advantage of Poly-L lysine. Serum with antibodies specific to red blood cell antigens was then added and the antigen-antibody reaction was detected by anti-human immunoglobulin coated indicator cells. It was show that the optimal conditions for this techniques were 0.4% panel cells suspension for plate coating, 0.1% anti-human immunoglobulin coated indicator cells prepared in 1% Bovine serum albumin in phosphate buffered saline pH 7.2 and the incubation time was over night at room temperature. Eighty serum samples were studied compared to standard method, indirect antiglobulin test (IAT) and the results were agreed. The results of 3 positive (3.75%) and 77 negative samples (96.25%) showed that microplate monolayer technique could be used to screen the unexpected antibodies as well as the IAT. In addition, the more advantage was that of large scale screening in a batch performing, minimizing the amount of panel cells employed per test and increasing the serum-to-cell ratio. Therefore, the reaction was clearly interpreted. Finally, MMT could be applied routinely for the antibody identification. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2003; 36: 178-184.

Key word: microplate monolayer, multiple transfusions, panel cells, antiglobulin test, poly L-lysine

* Fourth year standing MT student, 2000

** Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

ความแตกต่างของแอนติเจนหมู่เลือดทำให้สามารถแบ่งหมู่เลือดออกเป็นระบบต่างๆ แต่ละระบบยังแบ่งย่อยได้หลายชนิด (type) ที่สำคัญคือระบบที่ก่อให้เกิดปัญหาในการให้เลือด

แอนติบอดีหมู่เลือดแบ่งตามลักษณะของการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ระบบใหญ่ๆ¹ คือ Regular antibodies หมายถึงแอนติบอดีหมู่เลือดระบบ ABO ซึ่งเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ (Natural occurring) และ Irregular antibodies (หรือ unexpected

antibodies) หมายถึงแอนติบอดีหมู่เลือดอื่นที่ไม่ใช่ระบบ ABO แอนติบอดีในหมู่เลือดนี้เกิดได้ทั้งแบบ natural occurring และแบบ immune type ซึ่งมีทั้งแบบ alloantibodies และ autoantibodies ในกลุ่มประชากรไทยพบ unexpected antibodies ได้บ่อยในกรณีของแอนติบอดีหมู่เลือดระบบ Lewis, Rh, P, MNSs, Kidd และ Duffy²

โดยทั่วไปการให้เลือดและส่วนประกอบของเลือดทำให้เกิดผลดีแก่ผู้ป่วยตามความประสงค์ของแพทย์ผู้รักษา แต่บางครั้งอาจเกิดอาการแทรกซ้อนหรืออาการที่ไม่พึงประสงค์ได้ และบางครั้งอาจรุนแรงถึงแก่ชีวิตได้ ปฏิกริยาส่วนใหญ่มักเป็นผลจากการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนหมู่เลือด หรือได้รับแอนติบอดีดังกล่าวที่มีอยู่ในเลือดผู้บริจาค ดังนั้นจึงต้องตรวจและคัดเลือกเลือดที่ไม่มีแอนติเจนจำเพาะต่อแอนติบอดีที่มีอยู่แล้วในตัวผู้ป่วย การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) ในปัจจุบันใช้วิธี Indirect antiglobulin test (IAT)³ แต่เนื่องจากปริมาณ ซีรัมและเซลล์ที่ใช้สิ้นเปลืองและยังทำได้เพียงคราวละหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีผู้ดัดแปลงนำ microplate ซึ่งในช่วงแรกใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจน HLA มาพัฒนาใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีหมู่เลือดโดยอ่านปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง⁴ ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเคลือบเม็ดเลือดแดงให้เป็นชั้นเดียว (monolayer) บน polystyrene microplate ซึ่งทำจากวัสดุ polypropylene หรือ polyvinyl⁵ นอกจากใช้ศึกษาปฏิกิริยาแล้วยังใช้สำหรับตรวจหาหมู่เลือด ABO (Forward และ Reverse grouping), Rh typing, ตรวจหาและจำแนกชนิดของ Unexpected antibodies การหาความแรงของแอนติบอดี การตรวจสอบความเข้ากันได้ของเลือด และการควบคุมคุณภาพของน้ำยา เป็นต้น

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี

การตรวจกรอง unexpected antibodies โดยใช้ Microplate Monolayer Technique (MMT)

วัสดุและวิธีการ

การเตรียม Red cell monolayer เดิม Poly L-lysine (Sigma) ซึ่งเจือจางเป็น 1:10 ในน้ำกลั่นลงใน U plate ในปริมาตร 100 ml/well อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชม. ก่อนล้างออกด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง จากนั้นเติม panel cell suspension ที่เจือจางใน phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ลงไปในปริมาตร 100 ml/well ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C รุ่งเช้าจึงนำเพลทไปปั่นที่ความเร็ว 75g นาน 5 นาทีและล้างเม็ดเลือดแดงส่วนที่ไม่เกาะเพลทด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ในการศึกษา unexpected antibodies ทำได้โดยการ block non specific binding site ก่อนด้วย 1% BSA-PBS pH 7.2 ปริมาตร 100 ml/well อบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. ก่อนล้างออกด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง จากนั้นจึงเติมซีรัมที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ml/well ลงในแต่ละหลุมอบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากล้างแอนติบอดีส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้ว เติม Rabbit anti-human globulin (สภากาชาดไทย) ปริมาตร 100 ml/well และอบที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาทีตามด้วยการล้างด้วยน้ำเกลืออีก 3 ครั้ง สุดท้ายเติม indicator red cells (human immunoglobulin coated blood group) ปริมาตร 100 ml/well จากนั้นจึงให้ทำปฏิกิริยาข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง อ่านผลการเกิด agglutination ของ indicator cells ในวันรุ่งขึ้น ซึ่งจะพบว่าหลุมที่ให้ผลบวกจะมีการเกิด agglutination เห็นเม็ดเลือดแดงแผ่กระจายเต็มหลุม ในขณะที่หลุมให้ผลลบจะพบเม็ดเลือดแดงตกอยู่ก้นหลุมเป็นเม็ดกระจุก ในการศึกษานี้ได้มีการทดลองเพื่อหา

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ panel cell ที่เตรียมเป็น monolayer ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ human immunoglobulin ที่ใช้เคลือบเซลล์หมู่เลือดโอ การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ immunoglobulin coated cells (indicator cells) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BSA-PBS pH 7.2 ที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับการเตรียม indicator cells จากนั้นจึงนำไปใช้ศึกษาหา unexpected antibodies ในตัวอย่างซีรัมจำนวน 80 ราย จากผู้ป่วยที่มีประวัติการได้รับเลือดมาแล้วอย่างน้อย 2 ครั้ง จากโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

ผลการทดลอง

พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ของการศึกษา unexpected antibodies ด้วย Microplate Monolayer technique (MMT) ได้แก่ 0.4% panel cells

สำหรับการเคลือบเพลทให้เป็น monolayer (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) เพราะสามารถพบการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดงแผ่เป็นชั้นเดียวเต็มกันหลุมเมื่อดูภายใต้กล้องชนิดหัวกลับ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ human immunoglobulin ที่ใช้เตรียม indicator cells คือ 1:10 และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ indicator cells คือ 0.1% ในตัวกลาง 1% BSA-PBS pH 7.2 (ตารางที่ 2) ซึ่งช่วยให้เซลล์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาดกลงที่กันหลุมเป็นวงแหวนขนาดเล็กและเห็นได้ชัดเจน (ตารางที่ 3)

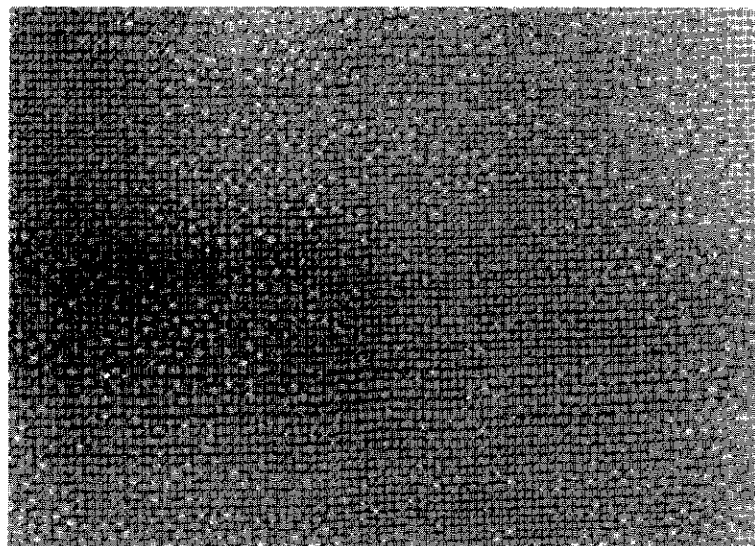
จากการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 80 ราย เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน Indirect antiglobulin test พบว่าให้ผลเหมือนกันคือพบผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการตรวจกรองแอนติบอดีมีจำนวน 3 ราย (3.75%) และผลลบ 77 ราย (96.25%)

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ panel red blood cells สำหรับเคลือบเพลท

Panel red blood cells	ผลภายใต้กล้องชนิดหัวกลับ
0.1%	Negative
0.2%	Negative
0.3%	Negative
0.4%	Positive
0.5%	Positive
0.6%	Positive

Negative หมายถึง panel red blood cells แผ่ไม่เต็มกันหลุม

Positive หมายถึง panel red blood cells แผ่เป็น monolayer เต็มกันหลุม



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ Monolayer ของ panel red blood cells ที่เคลือบบนเพลท

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ indicator cells ในการทำปฏิกิริยา

Indicator cells	ลักษณะที่อ่านได้
0.1%	อ่านผลบวกและผลลบได้ชัดเจน
0.2%	อ่านผลบวกและผลลบได้ชัดเจน
0.3%	Positive control มี indicator cells เหลือตกเป็นเม็ดกระดุม
0.4%	Positive control มี indicator cells เหลือตกเป็นเม็ดกระดุม

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BSA-PBS pH 7.2 ที่ใช้เป็นตัวกลางสำหรับเตรียม indicator cells

BSA-PBS (%)	ลักษณะที่อ่านได้
1%	เซลล์ตกเป็นวงแหวนขนาดเล็ก ชัดเจน
2%	เซลล์ตกเป็นวงแหวนขนาดเล็ก ไม่ชัดเจน
3%	เซลล์ตกเป็นวงแหวนขนาดเล็ก ไม่ชัดเจน
4%	เซลล์ตกเป็นวงแหวนขนาดเล็ก ไม่ชัดเจน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าการใช้ MMT สามารถตรวจกรอง unexpected antibodies ได้ผลเช่นเดียวกับการใช้วิธีมาตรฐาน IAT จึงเห็นได้ว่าสามารถนำวิธีนี้มาใช้ในห้องปฏิบัติการได้ดีเช่นเดียวกัน

เนื่องจาก Poly L-lysine มีราคาแพงจึงทำให้ต้นทุนของ MMT สูงกว่าวิธีมาตรฐาน IAT แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณที่ใช้ไปในการเคลือบเพลทแต่ละหลุมนั้นน้อยมาก เพราะสามารถนำส่วนที่เหลือในแต่ละหลุมกลับมาใช้ได้อีก และยังคงมีประสิทธิภาพดีอยู่ (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้นแม้ว่าจะมีราคาแพงแต่เมื่อคำนวณต้นทุนต่อหนึ่งการทดสอบพบว่าถูกกว่าวิธี IAT อย่างไรก็ดีตามแม้ว่าจะมีข้อด้อยที่ชัดเจนของวิธีนี้คือมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานานมาก แต่ก็เหมาะที่จะนำไปใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการได้ ยกเว้นถ้าต้องการตรวจกรองแอนติบอดีในกรณีเร่งด่วนจึงควรพิจารณาใช้วิธี IAT แทนเพราะได้ผลเร็วกว่า

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ BSA PBS pH 7.2 เป็นตัวกลางในการเตรียม indicator cells

ช่วยให้เห็นปฏิกิริยาที่ให้ผลลบชัดเจนขึ้นกว่าการเตรียมในตัวกลางน้ำเกลือหรือ PBS ที่ไม่มี BSA และพบว่าการใช้ U plate ให้ปฏิกิริยาการอ่านผลลบได้ชัดเจนกว่าการใช้ V plate การใช้ MMT นอกจากจะสามารถตรวจกรองแอนติบอดีแล้วยังสามารถใช้ในการศึกษาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม MMT มีข้อดีและข้อเสียที่ควรคำนึงถึง ข้อดีคือลดปริมาณการใช้ panel cells ที่ใช้ต่อรายของการตรวจ สามารถเพิ่มอัตราส่วนของซีรัมต่อ เซลล์ (serum-to-cell ratio) เป็นการช่วยเพิ่มความแรงของแอนติบอดีต่อแอนติเจน นอกจากนี้ยังสามารถทำได้รวดเร็วหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ช่วยลดจำนวนเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงาน และลดพื้นที่ในการทำงาน ส่วนข้อเสียคือการทดลองมีหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่า

References

1. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th Edition. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1975: 92-369

2. พิมล เขียวศิลป์ การให้เลือด ครั้งที่ 1 กรุงเทพ, โรงพิมพ์พิมพ์เนศ 2526, 36-68.
3. Turgeon ML. Fundamental of Immunohe-
matology Theory and techniques. 2nd
Edition. Philadelphia, William&Wilkins,
1995, 283-398.
4. 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
of Red Blood Cell Antibodies. Vox Sang,
1996; 70:152-56.
5. Sallander S, Shanwell A, Pegert S,
Jakobson L, Wiechel BA. A Solid-phase
Test using Antiglobulin and Enzyme
Enhance Techniques for Erythrocyte
Antibody Screening during Pregnancy.
Vox Sang, 1995; 68:22-26.