

Review article

Antibody screening and identification in transfusion medicine and benefits of antibody in development of human monoclonal hybridoma for blood group reagent production

Siriporn Ponsen*, Nootchanat Premprayoon, Udom Tingtoy

Antiserum and Standard Cell Preparation Section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

Antibody against ABO blood group has been called naturally occurring antibody or regular antibody or expected antibody while other blood group system shows an unexpected antibody which is composed of alloantibody and autoantibody. Alloantibody does not respond against person's red blood cells antigens. On the other hand, autoantibody does recognize red blood cells antigens.

Antibody screening and identification are the main procedure before blood transfusion due to immediate or delayed hemolytic transfusion reactions (HTR) from antibody. Moreover, they are the cause of hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) and shorter self-life of red blood cells.

Plasma or serum including of single high-titer antibody shows benefits in the production of blood group typing reagents. Especially, B lymphocytes secrete single antibody to make benefits in production of human monoclonal hybridoma for rare blood group reagents.

This article needs to compile many antibody screening and antibody to identify methods and exemplify interesting study reports of antibody screening and identification by using different methods of choice of medical scientists and medical technologists. Moreover, it will help them choose suitable methods and provides some idea about how to make benefits from antibody in plasma and B lymphocytes secreting antibody.

Keywords: Antibody, antibody screening and identification, benefits of antibody.

***Correspondence to:** Siriporn Ponsen, Antiserum and Standard Cell Preparation Section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: phasai_nang@hotmail.com

Received: July 9, 2019

Revised: August 2, 2019

Accepted: August 7, 2019

บทฟื้นฟูวิชาการ

การตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีในเวชศาสตร์ บริการโลหิตและประโยชน์ของแอนติบอดี ในงานพัฒนาน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัลแอนติบอดี

ศิริพร พลเสน, นุชนาฏ เปรมประยูร, อุดม ตั้งต้อย

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรุ่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

แอนติบอดีในหมู่โลหิตระบบ ABO เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ และจึงเรียกว่า naturally occurring antibody หรือ regular antibody หรือ expected antibody นอกจากนี้แอนติบอดีในหมู่โลหิตระบบต่าง ๆ นอกเหนือจากระบบ ABO เรียกว่า unexpected antibody ซึ่งส่วนมาก unexpected antibody ที่พบเป็น alloantibody คือ แอนติบอดีที่ไม่ตรงกับแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงของผู้สร้าง และ autoantibody คือ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงของผู้สร้างเอง

การตรวจกรอง (antibody screening) และตรวจแยกแอนติบอดี (antibody identification) มีความสำคัญมากในงานธนาคารเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต เนื่องจากแอนติบอดีบางชนิดทำให้เกิด immediate หรือ delayed hemolytic transfusion reactions (HTR) และทำให้เกิด hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) รวมไปถึงเป็นสาเหตุทำให้เม็ดโลหิตแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ

แต่พลาสมาที่มีแอนติบอดียังมีประโยชน์สามารถนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต และนอกจากนี้ยังสามารถนำ B lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดีชนิดเดียวมาใช้ในงานพัฒนาน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี

บทความนี้เป็นการรวบรวมวิธีการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดี พร้อมทั้งยกตัวอย่างรายงานการศึกษาการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีด้วยวิธีต่าง ๆ ที่น่าสนใจเพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้ปฏิบัติงานด้านธนาคารเลือด นอกจากนี้ยังช่วยให้ผู้ปฏิบัติงานเลือกวิธีที่เหมาะสมในการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดี และบทความนี้ยังนำเสนอแนวคิดในการใช้ประโยชน์จากพลาสมาที่มีแอนติบอดีและ B lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดี

คำสำคัญ: แอนติบอดี, การตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดี, ประโยชน์ของแอนติบอดี.

หมู่โลหิต ABO ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2443 โดย Land Steiner และต่อมาได้มีการค้นพบหมู่โลหิตเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ หมู่โลหิตระบบ ABO นอกจากมีแอนติเจนบนผิวเม็ดโลหิตแดงแล้วยังมีแอนติบอดีที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (naturally occurring antibody หรือ regular antibody หรือ expected antibody) ที่ไม่จำเพาะกับชนิดของแอนติเจน เช่น แอนติบอดี A, B และ A ร่วมกับ B ซึ่งเกิดขึ้นโดยธรรมชาติจากสารคล้ายแอนติเจนของเม็ดโลหิตแดง (blood group antigen like substances) ที่พบในอาหาร พืช เชื้อจุลินทรีย์ และวัคซีนบางชนิด⁽¹⁾ หรือเกิดจากการกระตุ้นของเม็ดโลหิตของทารกขณะตั้งครรภ์^(2, 3) นอกจากนี้แอนติบอดียังพบในหมู่โลหิตระบบต่าง ๆ นอกเหนือจากระบบ ABO ซึ่งเรียกว่า unexpected antibody เช่น แอนติบอดีในระบบ Lewis, P, MNSs, Rh, Kidd, Duffy เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าส่วนมาก unexpected antibody ที่พบเป็นชนิด alloantibody คือ แอนติบอดีที่ไม่ตรงกับแอนติเจนที่มีในผู้รับ และชนิด autoantibody คือ แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของผู้รับเอง⁽⁴⁾

การตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีมีความสำคัญมากต่อการให้และรับโลหิต เนื่องจากแอนติบอดีบางชนิดทำให้เกิด immediate หรือ delayed hemolytic transfusion reactions (HTR) และทำให้เกิด hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN)⁽⁵⁾ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เม็ดโลหิตแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ⁽⁶⁾ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบก่อนการให้โลหิต (pre-transfusion testing) ประกอบด้วย การตรวจหมู่โลหิต ABO และ Rh(D) การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) ในพลาสมาหรือซีรัมของผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต และการตรวจความเข้ากันได้ของโลหิต หากผลตรวจกรองแอนติบอดีในผู้ป่วยให้ผลบวกต้องตรวจแยกแอนติบอดีและคัดเลือกโลหิตผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วย (antigen-negative blood)⁽⁷⁾

การตรวจกรองแอนติบอดี

วิธีการตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธีหลอดทดสอบมาตรฐาน (STT)

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วย pool O cells หรือ screening cells (O1, O2) ด้วยวิธี STT โดยอ่านปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (22 - 24 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส และ indirect antiglobulin (IAT) มีวิธีการทดสอบดังนี้ หยดพลาสมาหรือซีรัมลงในหลอดทดลองขนาด 10 X 75 มิลลิเมตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วหยด 2 - 5% pool O cells suspension หรือ 2 - 5% screening cells suspension ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล จากนั้นล้าง 3 รอบด้วยน้ำเกลือ (0.85% normal saline) โดยบันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที ครั้งสุดท้ายขับให้แห้งแล้วหยด anti-human globulin serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 วินาทีอ่านผลด้วยตาเปล่าและอ่านผลลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์^(4, 8 - 9)

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี enzyme technique^(10 - 13)

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี enzyme technique เป็นการย่อยเม็ดโลหิตแดงด้วยเอนไซม์ เช่น trypsin, bromelain, ficin และ papain เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของหมู่โลหิตบางระบบ เช่น Rh, Kidd, Lewis และ P แต่จะยับยั้งปฏิกิริยาหมู่เลือดระบบ Duffy และ MNSs⁽¹⁴⁾ โดยแบ่งเป็น 2 วิธี ดังนี้ วิธี one-stage enzyme เป็นการหยดเม็ดโลหิตแดงปริมาตร 50 ไมโครลิตร และพลาสมาหรือซีรัมปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วหยดเอนไซม์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผลและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล และวิธี two-stage enzyme technique เป็นการย่อยเม็ดโลหิตแดงด้วยเอนไซม์ ก่อนนำไปหยดกับพลาสมาหรือซีรัม เริ่มจากหยดพลาสมาหรือซีรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วยหยดเซลล์เม็ดโลหิตแดงที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผลและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บันทึกความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล ทั้งนี้การตรวจกรองด้วยวิธี enzyme technique มักทำให้ตรวจพบ cold antibody ที่ไม่มีความสำคัญทาง

คลินิก เช่น anti-I ซึ่งมีการศึกษาแนะนำว่าวิธี enzyme technique เหมาะสมสำหรับการตรวจแยกแอนติบอดีมากกว่าการตรวจกรองแอนติบอดี⁽¹⁵⁾

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี gel technique

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี gel technique โดยทั่วไปนิยมใช้ gel card ชนิด LISS Coombs card ซึ่งมี anti-human globulin serum บรรจุอยู่ LISS Coombs card เหมาะสำหรับการตรวจแอนติบอดีชนิด IgG การทดสอบทำได้โดยการดูด 0.8% screening cells suspension ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ suspend อยู่ใน LISS (low ionic strength solution) จากนั้นดูดพลาสมาหรือซีรัมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงใน chamber นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใน incubator สำหรับ gel card โดยเฉพาะ จากนั้นปั่นในเครื่องปั่นสำหรับ gel card ที่ความเร็วรอบ 490 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อ่านผล⁽⁴⁾ แต่แอนติบอดีบางชนิดที่เป็น IgM เช่น anti-Le^a, anti-Le^b, anti-M, anti-N และ anti-P1 มักตรวจไม่พบด้วย LISS Coombs card จึงควรใช้ neutral card ซึ่งมี gel และ buffered salt solution แต่ไม่มี anti-human globulin serum บรรจุอยู่

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี solid-phase microplate antiglobulin technique⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี solid-phase microplate antiglobulin technique (SPMAT) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจกรองแอนติบอดีโดยอาศัยหลักการเคลือบ immunoglobulin (IgG) บนไมโครเพลทและให้แอนติบอดีในพลาสมาหรือซีรัมทำปฏิกิริยากับ screening cells ในไมโครเพลท โดยเตรียม RBC monolayer plate และ indicator cells (IgG anti-D sensitized cells) นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไมโครเพลทมาใช้ให้เอาออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย PBS (pH 7.0 - 7.2) 4 รอบ โดยเครื่องล้างไมโครเพลท จากนั้นหยด LISS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และหยดพลาสมาหรือซีรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูด LISS และพลาสมาหรือซีรัมในไมโครเพลททิ้ง แล้วล้างด้วยเครื่องล้างไมโครเพลทหรือ multichannel pipette แล้วจึงหยด anti-human globulin serum ปริมาตร 100

ไมโครลิตร และหยด 0.2% indicator cells suspension (IgG anti-D sensitized cells) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลทที่ความเร็ว 600 g เป็นเวลา 2 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าใต้แสงไฟ (illuminated surface)

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี column agglutination technique (CAT)

การตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี CAT นิยมใช้ card ชนิด anti-IgG; c3d polyspecific และ screening cells ที่เจือจางให้เป็น 0.8% cells suspension ด้วย red cell diluent ทดสอบกับพลาสมาหรือซีรัมที่ต้องการการตรวจโดยวิธี CAT ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดใน column โดยการปั่นให้เม็ดโลหิตแดงตกผ่านตัวกลางซึ่งอาจจะเป็น gel particle หรือ micro glass beads โดยเม็ดโลหิตแดงที่ไม่จับกลุ่มจะผ่านลงก้นหลุม แต่เม็ดโลหิตแดงที่จับกลุ่มจะค้างอยู่ด้านบนหรือกระจายอยู่ใน column⁽¹⁹⁾ วิธีนี้ใช้ได้ทั้งการตรวจกรองและการตรวจแยกแอนติบอดี⁽²⁰⁾ แต่ข้อจำกัดของวิธี CAT ไม่สามารถตรวจกรองแอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ IgG ได้ใน card เดียวกัน จึงควรเลือกใช้ชนิดของ card ให้เหมาะสมกับชนิดของแอนติบอดี

การตรวจแยกแอนติบอดี

การตรวจแยกแอนติบอดีด้วยวิธี STT

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดี ด้วยวิธีต่าง ๆ ข้างต้นมาทำการตรวจแยกแอนติบอดีด้วย panel cells (ทั้งหมด 11 เบอร์) โดยเขียนหมายเลข 1 - 11 บนหลอดทดลองขนาด 10 × 75 มิลลิตร หยดพลาสมาหรือซีรัมลงในหลอดทดลองทั้งหมด 11 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นหยด 2 - 5 % panel cells suspension หลอดละ 50 ไมโครลิตร โดยหยดให้หมายเลขหลอดและขวดตรงกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผล จากนั้นปั่นล้าง 3 รอบ ด้วยน้ำเกลือที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที ครึ่งสุดท้ายซับให้แห้งแล้วหยด anti-human globulin serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400

รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และอ่านผลลบบนไตกล้องจุลทรรศน์ แปลผลตาม key panel เพื่อแยกชนิดของแอนติบอดี^(8, 21)

การตรวจแยกแอนติบอดีด้วยวิธี solid-phase microplate antiglobulin technique

วิธีนี้เป็นการนำ solid-phase microplate antiglobulin technique มาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกแอนติบอดี โดยแบ่งเป็นการตรวจแยกแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ซึ่งเทคนิค direct agglutination microplate technique (DAMT) ใช้ตรวจแยกแอนติบอดีชนิด IgM และเทคนิค solid-phase microplate antiglobulin technique (SPMAT) ใช้ตรวจแยกแอนติบอดีชนิด IgG โดยเริ่มจากการเตรียม DAMT⁽²²⁾ และ SPMAT⁽¹⁸⁾ แต่เปลี่ยนจากเดิมที่ใช้ pool O cells หรือ screening cells เป็น panel cells เคลือบบนไมโครเพลท

ขั้นตอนการตรวจแยกแอนติบอดีชนิด IgM ด้วยเทคนิค DAMT โดยหยดพลาสมาหรือซีรัมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามหลุมหมายเลข 1 - 11 จากนั้นหยด 2% panel cells suspension หมายเลขละ 25 ไมโครลิตร ให้ตรงตามหลุมหมายเลข 1 - 11 ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลท ที่ความเร็ว 600 g เป็นเวลา 2 นาที เคาะไมโครเพลทเพื่ออ่านปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า หรือตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เคาะไมโครเพลทเพื่ออ่านปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า⁽²²⁾

ขั้นตอนการตรวจแยกแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยเทคนิค SPAMT เริ่มต้นล้าง RBC panel monolayer plate 3 รอบ ด้วย PBS จากนั้นหยด LISS และพลาสมาหรือซีรัมอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เคลือบด้วย panel cells ไว้ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้าง 3 รอบด้วย PBS โดยใช้เครื่องล้างไมโครเพลท หรือล้าง 5 รอบด้วย multichannel pipette จากนั้นหยด anti-human globulin serum ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และหยด 0.2% indicator cells suspension (IgG anti-D sensitized cells) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลท ที่ความเร็ว 600 g เป็นเวลา 2 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าใต้แสงไฟ (illuminated surface)^(18, 22)

การทดสอบความแรงของแอนติบอดี (antibodies titration) การทดสอบความแรงของแอนติบอดีด้วยวิธี (STT)⁽²³⁾

เมื่อทราบชนิดแอนติบอดีจากการตรวจแยกแอนติบอดีแล้ว ทำการทดสอบความแรงแอนติบอดี ด้วยวิธี two-fold serial dilution โดยเรียงหลอดทดลองขนาด 12 × 75 มิลลิเมตรและขนาด 10 × 75 มิลลิเมตร อย่างละ 12 หลอด จำนวน 2 ชุด ชุดที่ 1 สำหรับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบความแรง และชุดที่ 2 สำหรับ positive control ดูดพลาสมาหรือซีรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 12 × 75 มิลลิเมตร หลอดที่ 1 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นดูดน้ำเกลือใส่หลอดที่ 2 - 12 หลอดละ 500 ไมโครลิตร และดูดพลาสมาหรือซีรัมจากหลอดที่ 1 มา 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดไปยังหลอดต่อไป จนถึงหลอดที่ 12 จากนั้นดูดสารละลายพลาสมาหรือซีรัมในหลอดทดลองขนาด 12 × 75 มิลลิเมตร ไปยังหลอดทดลองขนาด 10 × 75 มิลลิเมตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร หยด 2% red blood cells suspension ที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ ลงในหลอดทดลองขนาด 10 × 75 มิลลิเมตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นหลอดที่มีสารละลายพลาสมาหรือซีรัมอยู่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อ่านผล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 37 นาที ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อ่านผล จากนั้นปั่นล้าง 3 รอบ ด้วยน้ำเกลือที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 วินาที รอบสุดท้ายซับให้แห้ง แล้วหยด anti-human globulin serum หลอดละ 100 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 3,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อ่านผล

การทดสอบความแรงของแอนติบอดีด้วยวิธีไมโครเพลท⁽²⁴⁾

วิธีนี้เหมาะสำหรับตัวอย่างพลาสมาหรือซีรัมปริมาณน้อยและมีความแรงแอนติบอดีต่ำ โดยดูดพลาสมาหรือซีรัมลงใน 96 well plate หลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดน้ำเกลือใส่หลุมที่ 2 - 12 หลุมละ 50 ไมโครลิตรและดูดพลาสมาหรือซีรัมจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดไปยังหลุมต่อไป ทำจนถึงหลุมที่ 12 และหยด 2% red blood cells suspension ที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ต้องการหาความแรง หลุมละ 25 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที อ่านผล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บั่นล้าง 3 รอบด้วยน้ำเกลือโดยใช้เครื่องปั่นไมโครเพลท รอบสุดท้ายขับให้แห้งหยด anti-human globulin serum หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที อ่านผล

รายงานการศึกษาความชุกของแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีตรวจต่าง ๆ

อมรรัตน์ ร่มพุกษ์ และคณะ ได้รายงานการศึกษาแอนติบอดีของหมู่โลหิตชนิดต่าง ๆ ในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากตัวอย่างโลหิตของผู้บริจาคของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2537 โดยการตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี STT และใช้วิธี enzyme technique (two stage enzyme technique) จากนั้นตรวจแยกแอนติบอดีด้วย panel cells และทดสอบ autoantibody พบว่าในผู้บริจาคโลหิตภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 24,195 ราย สร้างแอนติบอดีจำนวน 2,439 ราย และแอนติบอดีที่พบมากเป็นอันดับแรกคือเป็น anti-P1 รองลงมาคือ anti-Lewis ส่วน anti-Mi^a พบมากเป็นอันดับสาม⁽²⁵⁾

ทองศักดิ์ ยีละ และคณะ ได้รายงานการศึกษาการตรวจกรองแอนติบอดีที่นอกเหนือจากแอนติบอดีในหมู่โลหิตระบบ ABO เมื่อปี พ.ศ. 2547 จากผู้บริจาคโลหิตที่หน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2544 - เดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2545 จากการตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี STT โดยทดสอบกับ pool O cells ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ papain และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาตรวจแยกแอนติบอดีด้วย panel cells พบว่าผู้บริจาคโลหิตจำนวน 26,527 ราย ให้ผลบวกจำนวน 265 ราย และแอนติบอดีที่พบมาก 3 อันดับแรกคือ anti-Lewis, anti-P1 และ anti-Mi^a ตามลำดับ⁽⁸⁾

ศจิกา ปลั่งกลาง และคณะ ได้รายงานการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธี STT และวิธี gel technique (DG Gel: Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) ในผู้บริจาคโลหิต เมื่อปี พ.ศ. 2557 ของโรงพยาบาลขอนแก่น จำนวน 929 ราย พบว่าวิธี STT ให้ผลบวกจำนวน 40 ราย และวิธี DG Gel ให้ผลบวกจำนวน 15 ราย ทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันจำนวน 15 ราย แต่ให้ผลบวกเฉพาะวิธี STT จำนวน 25 ราย และแอนติบอดีที่พบมากในวิธี STT คือ anti-P1 แต่วิธี DG Gel ไม่สามารถตรวจได้⁽⁹⁾

สาริสา จิตตระกูล และคณะ ได้รายงานการศึกษาความชุกและความจำเพาะของแอนติบอดีในพลาสมาผู้บริจาคโลหิต เมื่อปี พ.ศ. 2561 จำนวน 4,834 ราย จากคลังเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์ ระหว่างเดือนมกราคม - เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2560 ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ โดยใช้วิธี CAT ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย พบว่าให้ผลบวกจากการตรวจกรองแอนติบอดีจำนวน 136 ราย และทำการตรวจซ้ำด้วยวิธี STT และ CAT อีกครั้ง ปรากฏว่าให้ผลบวกซ้ำจำนวน 81 ราย และตรวจแยกแอนติบอดีพบว่าเป็นแอนติบอดีในระบบ Lewis, MNSs และ anti-Mi^a ตามลำดับ⁽²⁰⁾

รายงานการศึกษาความชุกของแอนติบอดีในผู้ป่วยด้วยวิธีตรวจต่าง ๆ

กาญจนา เอื้อตระกูลพูนสุข และคณะ ได้รายงานการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดี เมื่อปี พ.ศ. 2542 ด้วยวิธี STT วิธี enzyme technique และหลายวิธีรวมกันในซีรัมผู้ป่วยโรงพยาบาลศิริราช จำนวน 28,708 ราย พบว่าการนำวิธี enzyme technique มาใช้ในการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดี เป็นการเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้รับโลหิตในการรักษา⁽¹¹⁾

อำไพพรรณ สามัง และคณะ ปี พ.ศ. 2554 ได้รายงาน การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ในมารดาและทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลศิริราช พบ ABO HDFN 63.9% และพบแอนติบอดีในโลหิตมารดาโดยที่ไม่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายโลหิตและให้คำแนะนำว่านอกจากการตรวจหาหมู่โลหิต ABO, Rh (D), DAT และ IAT แล้ว ควรทำ elution ร่วมด้วยทุกราย เพื่อบอกชนิดของแอนติบอดี ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการเตรียมโลหิตหากมีการเปลี่ยนถ่ายโลหิตให้ทารกและป้องกันสำหรับการตั้งครรภ์ครั้งต่อไปหากมารดาเป็น Rh ลบ⁽¹³⁾

ภัทราภรณ์ ชะนังกลาง และคณะ เมื่อปี พ.ศ. 2555 ได้รายงานการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีในผู้เข้ารับการตรวจร่างกาย จากบริการวิชาการชุมชน คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าชนิดแอนติบอดีที่สามารถตรวจแยกได้เป็น anti-Mi^a, anti-P1 และ anti-D ในผู้ที่มีประวัติเคยรับโลหิตและผู้หญิงที่เคยตั้งครรภ์ ส่วน anti-M พบในชายที่ไม่เคยมีประวัติการรับโลหิต⁽²⁶⁾

เมื่อปี พ.ศ. 2559 อรรถพงษ์ สีนิกจาทรรพย์ และคณะ ได้รายงานการศึกษาความชุกของแอนติบอดีในกลุ่มผู้ป่วยรับโลหิตและหญิงตั้งครรภ์โรงพยาบาลตากสินพบว่า anti-E และ anti-Mi^a พบมากในกลุ่มผู้ป่วยรับโลหิต และ anti-P1 พบมากในหญิงตั้งครรภ์⁽²⁷⁾ และในปีเดียวกัน พสุพร โพธิ์เงินนาค และคณะ ได้รายงานความชุกของแอนติบอดีในผู้ป่วยแถบภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยพบว่าผู้ป่วยที่เข้ารับการคัดกรองและตรวจแยกแอนติบอดีมีการสร้าง anti-Mi (anti-Miltenberger), anti-E, anti-P1, anti-Le^a และ anti-Le^b มากตามลำดับ จึงแนะนำให้สำรวจโลหิตที่ไม่มีแอนติเจน Mi, E, P1, Le^a และ Le^b เพื่อใช้เพียงพอสำหรับผู้ป่วยที่ต้องการใช้โลหิต⁽²⁸⁾

เมื่อปี พ.ศ. 2560 ฉลาพรรณ บุตรโยชน์โท และคณะ ได้รายงานการศึกษาการตรวจกรองแอนติบอดีและความชุกของแอนติบอดีในผู้ป่วยที่ขอใช้โลหิตจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ด้วยวิธี STT ร่วมกับวิธี enzyme technique และใช้ LISS/ gel test พบว่าการตรวจกรองแอนติบอดีด้วยวิธี LISS/ gel test พบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้มากกว่าวิธี STT และวิธี enzyme technique⁽²⁹⁾

ดังนั้นการตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องความสะดวก ความเหมาะสมกับชนิดแอนติบอดีและต้นทุน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบความแตกต่าง ข้อดีข้อเสีย ของแต่ละวิธีการตรวจ

วิธีการ	ข้อดี	ข้อเสีย
STT	ต้นทุนต่ำและสามารถใช้ตรวจแอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ IgG	ใช้เวลานาน และต้องใช้ความชำนาญสูง
Enzyme technique	เร่งปฏิกิริยาหมู่เลือดบางระบบ เช่น Rh, Kidd, Lewis และ P นอกจากนี้ยังช่วยให้ตรวจพบแอนติบอดีที่มีปริมาณต่ำ	ยับยั้งปฏิกิริยาหมู่เลือดบางระบบ เช่น Duffy และ MNSs และตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มี
Gel technique	สะดวกในการใช้และง่ายต่อการแปลผล	ความสำคัญทางคลินิก เช่น anti-I มีข้อจำกัดในการเลือกชนิดของ gel card ให้เหมาะสมกับชนิดแอนติบอดีและต้นทุนค่อนข้างสูง
Solid-phase microplate antiglobulin technique	เหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ใช้ปริมาณพลาสมาหรือซีรัมน้อย ผลของปฏิกิริยาสามารถเก็บไว้อ่านได้ 2-3 วัน และเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกไม่ต้องล้าง Coombs	การเตรียมอุปกรณ์และน้ำยา ค่อนข้างยากและต้นทุนอุปกรณ์สูงกว่าวิธี STT
CAT	สะดวก ใช้งานง่าย ประหยัดเวลาและเหมาะกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก	ปฏิกิริยาการตรวจแอนติบอดีชนิด dosage effect เช่น anti-P1, anti-K, anti-Jk ^a และ anti-Fy ^a ได้
		ปฏิกิริยาน้อยกว่าวิธี STT มีข้อจำกัดในการเลือกชนิดของ card ให้เหมาะสมกับชนิดแอนติบอดีและต้นทุนค่อนข้างสูง

การประยุกต์ใช้แอนติบอดีให้เกิดประโยชน์

ถึงแม้ว่าแอนติบอดีในโลหิตก่อให้เกิดความยุ่งยากและผลเสียในงานธนาคารเลือดแล้ว แต่ยังมีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ในอดีตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A, anti-B, anti-A,B และอื่น ๆ เป็นชนิดโพลีโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตจากการนำพลาสมาของคนที่สร้างแอนติบอดีที่มีความแรงสูงตามมาตรฐานสากลมาแปรสภาพเป็นซีรัม⁽⁸⁾ แต่จะมีข้อจำกัดในเรื่องความแรงแต่ละ lot ที่ผลิตไม่เท่ากันหรือมีความแรงต่ำ ทำให้ตรวจหมู่โลหิตย่อย (subgroup) ไม่ได้⁽³⁰⁾ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการสร้างเซลล์สายพันธุ์โมโนโคลนัลจากหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตและประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Voak D. และคณะ⁽³¹⁾ สำหรับประเทศไทยมีรายงานการประสบความสำเร็จครั้งแรกในการสร้างเซลล์สายพันธุ์โมโนโคลนัลจากหนูเพื่อทดแทนการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตด้วยพลาสมาของคน โดยฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เมื่อปี พ.ศ. 2534^(32 - 36) และมีการพัฒนาเรื่อยมา ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการสร้างเซลล์สายพันธุ์โมโนโคลนัลเพื่อผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตชนิดหายากจาก B lymphocytes ของคนที่สร้างแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค human monoclonal hybridoma และประสบความสำเร็จนับตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2559 เป็นต้นมาและปัจจุบันได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง^(24, 37 - 38)

สรุป

การตรวจกรองและตรวจแยกแอนติบอดีมีความสำคัญมากในงานบริการโลหิต และมีวิธีการตรวจที่หลากหลายจึงต้องเลือกใช้วิธีที่เหมาะสม ความรวดเร็วในการแปลผล ชนิดแอนติบอดีและงบประมาณ เพราะแต่ละวิธีอาจจะให้ผลที่แตกต่างกันได้ เช่น บางวิธีไม่สามารถตรวจกรองแอนติบอดีบางชนิดได้หรืออาจตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิก หากใช้วิธีการตรวจไม่เหมาะสมจะทำให้เสียเวลา และส่งผลเสียต่อการรับโลหิตของผู้ป่วยแต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีก็มีประโยชน์ในงานผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตเป็นอย่างมาก เพราะสามารถนำพลาสมาที่มีแอนติบอดี ซึ่งมีความแรงตามมาตรฐานสากลและเป็นแอนติบอดีชนิดเดี่ยวมาแปรสภาพเป็นซีรัมเพื่อผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต และนอกจากนี้ยังสามารถนำ B lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดีชนิดหายากและเป็นชนิดเดี่ยวมาพัฒนาสร้างเซลล์สายพันธุ์โมโนโคลนัล

โดยใช้เทคนิค human monoclonal hybridoma เพื่อผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตชนิดหายากและผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตได้

เอกสารอ้างอิง

1. ยูพา เอื้อวิจิตรอรุณ. ความสำคัญของการตรวจหาแอนติบอดีในระบบ ABO. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2558;25:347-54.
2. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6thed. Oxford: Blackwell Scientific Publications;1975.
3. Millison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Mollison's blood trans-fusion in clinical medicine. 10thed. Oxford: Blackwell Science; 1997.
4. จริยา สายพิน. เทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546; 13:225-32.
5. Nathalang O. Laboratory indications and application of antibody detection. J Hematol Transfus Med 2018;28:115-8.
6. Bejrachandra S. Clinically significant of blood group antibody. J Hematol Transfus Med 2005; 15:211-5.
7. Ponsen S, Phonimit S, Premprayoon N, Kerdkaewngan K, Tingtoy U. Production of human hybridoma secreting monoclonal antibody against Rh(E) antigen. J Hematol Transfus Med 2019;29: 83-90.
8. Yeela T, Buathong W. Screening and identification of irregular antibodies in blood donation. Songkla Med J 2004;22:89-93.
9. Plungklang S, Urwijitaroon Y. Unexpected antibodies among blood donors detected by standard tube test and column gel agglutination test: A study for safe blood transfusion. J Hematol Transfus Med 2014;24:17-23.
10. Low B. A practical method using papain and incomplete Rh antibodies in routine Rh Blood-grouping. Vox Sang 1955;5:94-8.
11. Outrakoolpoonsuk K, Bejrachandra S, Saipin J, Leehaphaiboonsakun W, Suratanarungsun V, Plubjuice P. Detection of red cell antibody by enzyme technique. J Hematol Transfus Med 1999;9:103-10.

12. Bejrachandra S. Enzyme. J Hematol Transfus Med 1999;9:99-102.
13. Saipin J, Bejrachandra S. Significance of red cell antibody detection in donated blood. J Hematol Transfus Med 2014;24:37-40.
14. Saipin J. Blood group antigens and antibodies. J Hematol Transfus Med 2008;18:3-6.
15. Issitt PD. Antibody detection and identification and compatibility testing. Applied blood group serology. 4thed. Durham, North Carolina: Montgomery Scientific Publications;1998. p. 877-80.
16. Rachel JM, Sinor LT, Beck ML, Plapp FV. A solid-phase antiglobulin test. Transfusion 1985; 25:24-6.
17. Uthemann H, Poschmann A. Solid phase antiglobulin test for screening and identification of red cell antibodies. Transfusion 1990;30:114-6.
18. Sakuldamrongpanich T, Tubrod J, Mekchay S. Development of a solid phase microplate antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. J Hematol Transfus Med 2003;13: 119-29.
19. Pipatvanichkul A, Chanetmahun U, Vipsoongnern Y, Thongbut J, Apaikawee W, Chaiwong K, et al. Evaluation of the efficiency of fully automated column agglutination technique for red cell antibody screening in blood donors at National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med 2018;28:131-6.
20. Chidtrakoon S, Jeumjanya N, Sasikarn W, Intharanut K, Nathalang O. Prevalence and specificity of red cell alloantibodies in repeated antibody screening among Thai blood donors. J Med Tech Assoc Thai 2018;46:6240-52.
21. Kerdkaewngam K, Posen S, Phonimit S, Tingtoy U, Phikulsod S. Generating the hybridoma cell line by murine monoclonal hybridoma technology for production anti-M and anti-N blood group phenotyping reagent. J Hematol Transfus Med 2014; 24:361-9.
22. Chanetmahun U, Urwijitaroon Y. Application of microplate assay for red blood cell antibody identification. J Hematol Transfus Med 2016;26: 17-26.
23. Samung A, Bejrachandra S, Nathalang O, Plubjui 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.
24. Ponsen S, Phonimit S, Premprayoon N, Tingtoy U. Production of anti-D human monoclonal antibody (IgM) using human monoclonal hybridoma technique. Chula Med Bull 2019;1:147-54.
25. Romphruk A, Urwijitaroon Y, Puapairoj C, Akkahart C, Pachot L, Pattayaso P. Unexpected antibodies in Northeastern-Thai. J Hematol Transfus Med 1994; 4:135-40.
26. Chanungklang P, Vongchan P. Screening and identification of alloantibodies in blood samples from community medical service project, faculty of associated medical sciences, Chiang Mai university. J Assoc Med Sci 2012;45:30-5.
27. Sinkitjasub A, Chanta P, Thienthaworn J. Prevalence of unexpected antibodies in transfused patients and pregnant woman at Taksin hospital. J Hematol Transfus Med 2016;26:347-55.
28. Pongernnak P, Sasjeenpong S, Chuesakul K, Pangwangthong K. The prevalence of red blood cell alloantibodies in lower northern Thailand. J Med Assoc Thai 2016;99:1337-43.
29. Butryojantho C, Junta N, Pimphumee R, Srichai S, Darunikorn P, Puapairoj C, et al. Antibody screening and the prevalence of unexpected antibodies in the patients of Srinagarind hospital. J Hematol Transfus Med 2017;27:27-33.
30. ทศนีย์ สกุลดำรงพานิช. น้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545;12:235-44.
31. Voak D, Sack S, Alderson T, et al. Monoclonal anti-A from a hybrid myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. Vox Sang 1980;39:134-40.

32. Phikulsod S, Poltlen R, Uthid K, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: I mouse response to immunization with different quantity and sources of B antigens. *J Hematol Transfus Med* 1991; 1:299-307.
33. Phikulsod S, Poltlen R, Uthid K, Kaewkitiroj P, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: II the study of the efficacy of the monoclonal anti-B compared with commercial monoclonal reagents and conventional polyclonal anti-B. *J Hematol Transfus Med* 1992;2:295-302.
34. Phikulsod S, Poltlen R, Kaewkitiroj P, Uthid K, Tingtoy U, Tubrod J. Monoclonal anti-A reagent using hybridoma technique prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. *J Hematol Transfus Med* 1992;2:373-81.
35. Tubrod J, Meesoontorn R, Sirisomboon P, Phikulsod S. The efficacy of monoclonal anti-A, anti-B, anti-A,B produced by National Blood Centre, TRCS. *J Hematol Transfus Med* 1995;5:180-5.
36. Kaewmongkol R, Tingtoy U, Sakuldamrongpanich T. Production of blood grouping monoclonal anti-A,B reagent using hybridoma technique. *J Hematol Transfus Med* 2000;10:175-81.
37. Boonhai S, Aiemumporn K, Tingtoy U. Production of a new anti-M monoclonal reagent using human hybridoma technology. *Chula Med J* 2016;60: 101-13.
38. Tingtoy U, Makechay S, Deesin P, Tubrod J. Production of human monoclonal Anti-P1 by using hybridoma technique. *J Hematol Transfus Med* 2017; 27:11-8.