**นิพนธ์ต้นฉบับ**

# แอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตซึ่งตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานและวิธีเจล: การศึกษาเพื่อความปลอดภัยของโลหิตบริจาค

**ศจิกา ปลั่งกลาง[1] และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ[2]**

*[1]ศูนย์คลังเลือดกลาง โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น*

*[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

***บทคัดย่อ:*** *Microcolumn gel agglutination เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทดสอบทางซีโรโลยีของเม็ดโลหิตแดง เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบที่ทำง่าย สะดวก แต่มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (standard tube test; STT) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินหาความชุกของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเม็ดโลหิตแดงในผู้บริจาคโลหิต และเปรียบเทียบความสอดคล้องของการตรวจกรองแอนติบอดี ระหว่างวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน และวิธีเจล (DG Gel: Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) ในผู้บริจาคโลหิต โรงพยาบาลขอนแก่น ผลการศึกษา การตรวจกรองแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต 929 ราย โดยไม่ซ้ำตัวบุคคล พบว่า STT ให้ผลบวก 40 ราย (4.31%) DG Gel ให้ผลบวก 15 ราย (1.61%) ทั้ง 2 วิธี ให้ผลบวกสอดคล้องกัน 15 ราย ประกอบด้วย anti-$Le^a$ 5 ราย anti-$Mi^a$ 4 ราย anti-$Le^a$+$Le^b$ 3 ราย anti-$Le^b$ 1 ราย anti-D 1 ราย และ anti-$Le^b$+$Mi^a$ 1 ราย ให้ผลบวกเฉพาะ STT อย่างเดียว 25 ราย ประกอบด้วย anti-$P_1$ 12 ราย anti-$Le^a$ 7 ราย anti-$Le^a$+$Le^b$ 4 ราย และ anti-$Le^b$ 2 ราย ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า STT มีความไวมากกว่า DG Gel ในการตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ($p = 0.0006$) โดย STT พบความชุกของการตรวจพบแอนติบอดีร้อยละ 4.31 ในขณะที่ DG Gel พบความชุกร้อยละ 1.61 DG Gel มีข้อจำกัดในการตรวจหา anti-$P_1$ ทั้ง 12 ราย และแอนติบอดีของระบบ Lewis บางราย ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยในประชากรไทย เนื่องจากมีความชุกของแอนติเจน $P_1$ negative สูงถึงร้อยละ 77 และ Le(a-b-) ร้อยละ 30 ถึงแม้ว่าแอนติบอดีกลุ่มนี้จะมีความสำคัญทางคลินิกน้อย แต่ถ้าทำปฏิกิริยาที่ 37°C ได้ อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการให้พลาสมาปริมาณมาก หรือ single donor platelet แก่ผู้ป่วยที่มีแอนติเจนจำเพาะกับแอนติบอดีในโลหิตบริจาค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็ก*

***Keywords :*** ● *ผู้บริจาคโลหิต* ● *การตรวจกรองแอนติบอดี* ● *ชนิดแอนติบอดี* ● *วิธีหลอดทดลองมาตรฐาน* ● *วิธีเจล*

***วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557;24:17-23.***

## บทนำ

International Society of Blood Transfusion (ISBT) ได้จัดระบบของหมู่โลหิตเป็น 30 ระบบ มีแอนติเจนอยู่ในระบบกว่า 300 ชนิด[1] ระบบที่มีความสำคัญในการบริการโลหิต ประกอบด้วย ABO, MNS, P, Rh, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd และ Diego[2] นอกจากจะพบแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงแล้ว ยังสามารถพบได้บนเกล็ดโลหิต เม็ดโลหิตขาว เซลล์เนื้อเยื่อ เช่น ผิวหนัง เยื่อบุอวัยวะภายใน บางชนิดพบอยู่ในพลาสมาหรือน้ำลายได้ด้วย เช่น ระบบ ABO, Lewis[3,4] แอนติเจนของเม็ดโลหิตแดงและสารในธรรมชาติที่มีโครงสร้างคล้ายแอนติเจน (antigen like substance) สามารถกระตุ้นให้ผู้ที่ไม่มีแอนติเจนดังกล่าว สร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเม็ดโลหิตแดงขึ้นกับการทำให้เม็ดโลหิตแดงถูกทำลายมากหรือน้อยเพียงใด หรือทำให้เกิดปฏิกิริยาเม็ดโลหิตแดงแตกในทารกที่มีหมู่โลหิตระหว่างแม่กับลูกเข้ากันไม่ได้ (hemolytic disease of the fetus and newborn) รวมทั้งทำให้ผู้ป่วยเกิดปฏิกิริยาจากการรับโลหิต (hemolytic transfusion reaction) ซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้[3,5] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องได้แก่ ชนิดของแอนติบอดีเป็น IgM หรือ IgG ถ้าเป็นชนิด IgG จะมีความสำคัญทางคลินิกมากกว่าชนิด IgM หรือ ธรรมชาติของแอนติบอดีบางระบบที่ต้องการคอมพลีเมนต์ (complement binding antibodies) ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง

*ได้รับต้นฉบับ 30 พฤษภาคม 2556 รับลงตีพิมพ์ 20 สิงหาคม 2556*

*ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ รศ.ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น E-mail address: yupaurw@kku.ac.th*

แอนติเจน-แอนติบอดี ทำให้เกิดการแตกของเม็ดโลหิตแดง เช่น IgM antibodies[6] ได้แก่ anti-A, anti-B, anti-$P_1$, anti-$Le^a$ หรือเป็น IgG antibodies ได้แก่ anti-D แอนติบอดีของระบบ Kidd และ Kell อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา ปริมาณ ความแรงของแอนติบอดี activity ของ mononuclear phagocytic system ปริมาณ และความหนาแน่นของแอนติเจน เป็นต้น[3]

แอนติบอดีของเม็ดโลหิตแดงสามารถจำแนกได้หลายแบบ[7] เช่น จำแนกตามลักษณะการพบ เช่น expected antibody หรือ regular antibody ได้แก่ anti-A, anti-B, anti-A,B และ unexpected antibody หรือ irregular antibody ซึ่งหมายถึงแอนติบอดีระบบอื่นๆ นอกเหนือจากระบบ ABO เช่น Lewis, MNS, P, Rh เป็นต้น จำแนกตามลักษณะการเกิด ได้แก่ naturally occurring alloantibody ซึ่งเป็น แอนติบอดีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จากการกระตุ้นของสารคล้ายแอนติเจนในอาหาร แบคทีเรีย วัคซีนบางชนิด ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4-25˚C และ immune alloantibody ที่เกิดขึ้นจากการได้รับส่วนประกอบโลหิต หรือ การตั้งครรภ์

เทคนิคการตรวจหา unexpected alloantibody มีหลายวิธี[8] วิธีมาตรฐานคือ วิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (standard tube test; STT) ซึ่งอ่านปฏิกิริยาขั้นตอนแรกที่ อุณหภูมิ 25˚C (IgM antibody) ที่อุณหภูมิ 37˚C (warm and remain IgM antibody) และ antiglobulin phase (IgG antibody) และมีวิธีเลือกอื่น (alternative method) เช่น microcolumn gel agglutination, solid phase microplate agglutination เป็นต้น

คลังเลือด โรงพยาบาลขอนแก่น ได้นำเทคนิค gel agglutination มาใช้ร่วมกับ STT ในการตรวจกรองแอนติบอดี และทดสอบความเข้ากันได้ในผู้ป่วย ในส่วนของโลหิตบริจาค ได้ส่งตรวจที่ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 6 ซึ่งปัจจุบันโรงพยาบาลขอนแก่นยังไม่มีการเก็บข้อมูล และมิได้ตรวจหาชนิดของแอนติบอดีที่พบในผู้บริจาคโลหิต ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องของการตรวจกรองแอนติบอดี ระหว่างวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (STT) และ DG Gel: Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain ในผู้บริจาคโลหิต เพื่อประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในงานประจำ และคุ้มค่า คุ้มทุน รวมทั้งหาความชุก และชนิดของแอนติบอดีที่ตรวจพบในโลหิตบริจาค ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการบริการโลหิตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำพลาสมาที่ตรวจพบแอนติบอดี เตรียมเป็นแอนติซีรัม สำหรับการทำ red cell typing ได้หากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม

## วัสดุและวิธีการ

### วัสดุ

**1. ตัวอย่างตรวจ** ซีรัมของผู้บริจาคโลหิตภายในโรงพยาบาลที่เหลือจากการทดสอบในงานประจำวัน ของคลังเลือด โรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่างเดือน **ตุลาคม 2555 ถึง ธันวาคม 2555 จำนวน** 929 ตัวอย่าง

**2. เซลล์และน้ำยาทดสอบ**

2.1 Screening cell O1 และ O2, Panel cells, น้ำยา Anti human globulin, Coombs control cell ผลิตภัณฑ์ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สำหรับการทดสอบ antibody screening และ antibody identification

2.2 DG Gel Neutral Card, DG Gel Coombs Card และ DG Gel LISS solution (Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) สำหรับการทดสอบ antibody screening และ antibody identification

2.3 Red cell typing antisera สำหรับตรวจ**แอนติเจน**บนผิวเม็ดโลหิตแดง

2.3.1 Commercial antisera ได้แก่ anti-$P_1$ (Diamed GmbH Switzerland) anti-$Le^a$, anti-$Le^b$ (Lorne Labs Lower earley RG6 4UT,UK)

2.3.2 Antisera ที่เตรียมจากซีรัมผู้บริจาคโลหิต ได้แก่ anti-$Mi^a$

**3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ**

3.1 เครื่องปั่นล้างเซลล์อัตโนมัติ Ultra CW (Helmer scientific, Indiana, United States)

3.2 เครื่องปั่นอ่านปฏิกิริยา HS-12 (Kokusan corporation, Saitama, Japan)

3.3 เครื่องอุ่นปฏิกิริยา (dry tube incubator)

3.4 เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Wadiana Compact with Wadiana C Software (Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) สำหรับการทดสอบ antibody screening test วิธีเจล

### วิธีการทดสอบ

**1. การตรวจกรองแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้บริจาคโลหิต**

1.1 การตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (STT)

Multiple phase saline antiglobulin test ประกอบด้วยขั้นตอนอุณหภูมิห้อง (25˚C), 37˚C และ antiglobulin phase ทดสอบโดยหยดซีรัมลงในหลอดทดลอง ที่บ่งชี้ตัวอย่างตรวจขนาด 10 x 75 มิลลิลิตร **จำนวน 2 หลอดๆ ละ 2 หยด เติม 3% screening**

cell O1 และ O2 อย่างละ 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นอ่านผล 15 วินาที ที่ความเร็วรอบ 3,400 rpm นำไปอุ่นที่ 37˚C 30 นาที ปั่นอ่านผลแล้ว **นำไปล้าง 3 ครั้ง** ด้วยเครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติ หยดน้ำยา anti human globulin 2 หยด ปั่นอ่านผล **ถ้าให้ผลลบนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อยืนยัน** อีกครั้ง **ควบคุมคุณภาพการทดสอบ ด้วยการหยดน้ำยา Coombs** control cell ในหลอดทดสอบที่ให้ผลลบทุกราย

1.2 การตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธีเจล (DG Gel test; DG Gel)

1.2.1 การตรวจกรองแอนติบอดีที่ RT โดย DG Neutral Gel[9]

DG Neutral Gel เป็นเจลที่ใช้ในการตรวจปฏิกิริยาของ**แอนติเจนและแอนติบอดี ชนิดที่ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิห้อง** 18-25 ˚C มีลักษณะเป็นแผ่นเจลที่มี 8 microcolumn ในเจลประกอบด้วย buffered salt solution ไม่มี Low-ionic strength solution (LISS) และน้ำยา anti human globulin ทดสอบโดยใช้ screening cell O1 และ O2 ความเข้มข้น 1% ใน DG Gel LISS solution จำนวน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับซีรัม 25 ไมโครลิตร incubateที่ 18-25˚C 15 นาที ปั่นอ่านผล 9 นาที อ่าน และแปลผลการทดสอบ ด้วย Wadiana C Software

1.2.2 การตรวจกรองแอนติบอดีที่ IAT โดย DG Coombs Gel[10]

DG Coombs Gel เป็นเจลที่ใช้ในการตรวจหาปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน**และแอนติบอดี ชนิดที่ทำปฏิกิริยาได้ดีที่** อุณหภูมิร่างกาย หรือ 37˚C มีลักษณะเป็นแผ่นเจลที่มี 8 microcolumn ในเจลประกอบด้วย LISS และ น้ำยา anti human globulin ทดสอบโดยใช้ screening cell O1 และ O2 ที่ความเข้มข้น 1% ใน DG Gel LISS solution จำนวน 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับซีรัม 25 ไมโครลิตร incubate ที่ 37˚C 15 นาที ปั่นอ่านผล 9 นาที อ่าน และแปลผลการทดสอบ ด้วย Wadiana C Software

**2. การตรวจหาชนิดแอนติบอดี (antibody identification)**

ตรวจหาชนิดของแอนติบอดี ด้วยวิธี STT: Multiple phase saline antiglobulin test ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกการตรวจกรองด้วย STT และ DG Gel ในกรณีที่ให้ผลบวกเฉพาะ DG Gel จะตรวจด้วยวิธีเจลโดยทดสอบกับ Panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

**3. การตรวจยืนยันผล (red cell typing)**

ทดสอบยืนยันผลชนิดแอนติบอดีที่ตรวจพบ ด้วยการทำ red cell typing โดยใช้น้ำยาแอนติซีรัมแต่ละชนิด **ที่จำเพาะ** แอนติบอดีที่ตรวจพบ ทดสอบกับเม็ดโลหิตแดงผู้บริจาคโลหิต ทั้งนี้ผลการทดสอบที่ได้ควรเป็นลบ โดยมี positive และ negative red cell control ทดสอบควบคู่ไปด้วย

**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

1. วิเคราะห์ผลการตรวจกรองแอนติบอดีระหว่าง STT และ DG Gel ด้วยสถิติ Z-test และหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบแอนติบอดี กับเพศ ของผู้บริจาคโลหิต โดยมีค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$

2. สถิติเชิงพรรณนา คำนวณความชุก **(prevalence) ของ** การตรวจพบแอนติบอดี และชนิดของแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตเป็นร้อยละ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยยึดหลักเกณฑ์ตามคำประกาศเฮลซิงกิ (Declaration of Helsinki) และแนวทางการปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี (ICH GCP) ให้ไว้ ณ วันที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ลำดับที่ 3.4.01: 48/2555 เลขที่ HE552268

## ผลการศึกษา

ผลการตรวจกรองแอนติบอดีโดย STT และ DG Gel ของผู้บริจาคโลหิต **จำนวน 929 ราย พบว่า STT ให้ผลบวกจำนวน** 40 ราย (4.31%) ให้ผลลบ 889 ราย (95.69%) DG Gel ให้ผลบวก 15 ราย (1.61%) ผลลบ 914 ราย (98.39%) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบแอนติบอดี ระหว่าง STT และ DG Gel พบว่า STT ตรวจพบแอนติบอดีได้มากกว่า DG Gel 2.7% (95%CI: 0.012-0.042) **และความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0006$)** ดัง Table 1

**Table 1.** Comparison of unexpected antibodies in blood donors detected by STT and DG Gel

| STT \ DG Gel | Positive | Negative | Total (%) | p value |
|---|---|---|---|---|
| Positive | 15 | 25 | 40 (4.31) | |
| Negative | 0 | 889 | 889 (95.69) | p = 0.0006 |
| **Total (%)** | **15 (1.61)** | **914 (98.39)** | **929 (100)** | |

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาผลบวก ที่ขั้นตอนต่างๆของ STT กับการเกิดปฏิกิริยากับ DG Neutral Gel และ DG Coombs Gel พบว่า STT ให้ผลบวกสอดคล้องกับ DG Neutral Gel และ DG Coombs Gel 7 ราย ให้ผลสอดคล้องเฉพาะกับ DG Coombs Gel อย่างเดียว 7 ราย, DG Neutral Gel อย่างเดียว 1 ราย และ ให้ผลบวกเฉพาะ STT แต่ DG Neutral Gel และ DG Coombs Gel ให้ผลลบ 25 ราย (Table 2)

การตรวจชนิดแอนติบอดีที่ให้ผลบวก โดย STT และ DG Gel ที่ให้ผลบวกสอดคล้องกันทั้งสองวิธี 15 ราย (37.50%) และผลไม่สอดคล้องกัน โดยให้ผลบวกเฉพาะ STT อย่างเดียว 25 ราย (62.50%) โดยแอนติบอดีที่ให้ผลบวกทั้งสองวิธี ประกอบด้วย anti-$Le^a$ 5 ราย, anti-$Mi^a$ 4 ราย, anti-$Le^a$+$Le^b$ 3 ราย, anti-$Le^b$ 1 ราย, anti-D 1 ราย และ anti-$Le^b$+$Mi^a$ 1 ราย และแอนติบอดีที่ให้ผลบวกเฉพาะ STT อย่างเดียว 25 ราย ประกอบด้วย anti-$P_1$ 12 ราย, anti-$Le^a$ 7 ราย, anti-$Le^a$+$Le^b$ 4 ราย และ anti-$Le^b$ 2 ราย (Table 3)

การเกิดปฏิกิริยาที่ขั้นตอนต่างๆ (thermal phase) ของแอนติบอดีที่ตรวจพบด้วย STT อย่างเดียว ประกอบด้วย anti-$P_1$ 12 ราย ทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ขั้นตอน **จำนวน 7 ราย ทำปฏิกิริยาที่** RT และ 37˚C 1 ราย ทำปฏิกิริยาเฉพาะที่ RT 4 ราย **แอนติบอดีระบบ Lewis จำนวน 13 ราย ประกอบด้วย anti-$Le^a$** 7 ราย ซึ่งทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ขั้นตอน **จำนวน 2 ราย ทำปฏิกิริยาเฉพาะที่** RT 5 ราย anti-$Le^b$ 2 ราย **ทำปฏิกิริยาที่ RT และ 37˚C** 1 ราย และ **ทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ขั้นตอน 1 ราย และ anti-$Le^a$**+$Le^b$ จำนวน **4 ราย ทำปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ขั้นตอน**

เมื่อวิเคราะห์การตรวจพบแอนติบอดี กับเพศ และอายุ ของผู้บริจาคโลหิต 929 ราย ประกอบด้วยเพศชาย 526 ราย เพศหญิง 403 ราย พบแอนติบอดีในเพศชาย 20 ราย (3.80%) เพศหญิง 20 ราย (4.96%) ผู้บริจาคโลหิตเพศชายมีความชุกของแอนติบอดีน้อยกว่าเพศหญิง 1.16% (95%CI: -3.84 ถึง 1.52) ซึ่งไม่ต่างกันอย่างมี**นัยสำคัญ** ($p = 0.388$) ช่วงอายุที่ตรวจพบคือ 17-60 ปี อายุเฉลี่ย 34 ปี **ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน** ($p > 0.05$)

ชนิดแอนติบอดีที่พบในผู้บริจาคโลหิตส่วนใหญ่ พบเป็น single antibody 39 ราย และพบ multiple antibodies เพียง 1 ราย (anti-$Le^b$+$Mi^a$) ความชุกของแอนติบอดีที่พบคือ anti-$P_1$ 30%, anti-$Le^a$ 30%, anti-$Le^a$+$Le^b$ 17.5%, anti-$Mi^a$ 12.5%, anti-$Le^b$ 10% และ anti-D 2.5%

**Table 2.** Reaction of antibodies positive by different phase of STT and DG Gel

| STT \ DG Gel | Neutral +/ Coombs+ | Coombs+ only | Neutral + only | Neutral -/ Coombs- | Total |
|---|---|---|---|---|---|
| RT only | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 |
| RT + 37˚C | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| AHG only | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 |
| RT + 37˚C + AHG | 7 | 3 | 1 | 14 | 25 |
| **Total** | **7** | **7** | **1** | **25** | **40** |

**Table 3.** Antibody specificities found in 40 blood donors

| Antibody specificity | STT+/ DG Gel + | STT+/ DG Gel - | Total (%) |
|---|---|---|---|
| Anti-$P_1$ | 0 | 12[(a)] | 12 (30.0) |
| Anti-$Le^a$ | 5 | 7[(b)] | 12 (30.0) |
| Anti-$Le^b$ | 1 | 2[(c)] | 3 (7.5) |
| Anti-$Le^a$+$Le^b$ | 3 | 4[(d)] | 7 (17.5) |
| Anti-$Mi^a$ | 4 | 0 | 4 (10.0) |
| Anti-D | 1 | 0 | 1 (2.5) |
| Anti-$Le^b$+$Mi^a$ | 1 | 0 | 1 (2.5) |
| **Total (%)** | **15 (37.50)** | **25 (62.50)** | **40 (100.0)** |

(a) 8 anti-$P_1$ reacted at RT + 37˚C and AHG; (b) 2 anti-$Le^a$ reacted at RT + 37˚C and AHG;
(c) 2 anti-$Le^b$ reacted at RT + 37˚C and AHG; (d) 4 anti-$Le^a$+$Le^b$ reacted at RT + 37˚C and AHG

## วิจารณ์

การตรวจหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต เป็นมาตรฐานการให้บริการโลหิตที่ปลอดภัยสำหรับผู้ป่วย **เทคนิคที่นำมาใช้ตรวจต้อง**มีความเหมาะสม ทั้งในด้านความไวของการทดสอบและต้นทุนค่าตรวจ การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบความสอดคล้องการตรวจกรองแอนติบอดีโดย STT และ DG Gel ในผู้บริจาคโลหิต โดยไม่ซ้ำตัวบุคคล **พบว่า STT ให้ผลบวก 40 ราย (4.31%) DG** Gel ให้ผลบวก 15 ราย (1.61%) STT และ DG Gel ให้ผลบวกสอดคล้องกัน 15 ราย (1.61%) แอนติบอดีที่ตรวจพบโดย STT อย่างเดียว 25 ราย (62.50%) ประกอบด้วย anti-$P_1$ 12 ราย, anti-$Le^a$ 7 ราย, anti-$Le^a$+$Le^b$ 4 ราย และ anti-$Le^b$ 2 ราย STT ตรวจพบแอนติบอดีได้มากกว่า DG Gel 2.7% (95%CI: 0.012-0.042) **โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.0006) การศึกษา**นี้พบว่า DG Gel ไม่สามารถตรวจพบ anti-$P_1$ ได้ และมีความไวน้อยกว่า STT ในการตรวจพบ แอนติบอดีของระบบ Lewis ที่ทำปฏิกิริยาได้ที่ 37˚C, 37˚C **และ IAT จำนวน 16 ราย ถึง**แม้แอนติบอดีชนิด IgM **จะมีความสำคัญทางคลินิกน้อยกว่า** IgG แต่ถ้าเกิดปฏิกิริยาที่ 37˚C และหรือ IAT **ได้ อาจทำให้เกิดภาวะ**แทรกซ้อนจากการรับโลหิตได้ Chandeysson PL et al[11] และ Arndt PA et al[12] รายงานผู้ป่วยที่เกิดทั้ง delayed และ acute hemolytic transfusion reaction ที่มีสาเหตุจาก anti-$P_1$ ซึ่งทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37˚C นอกจากนี้ Thakral B et al ได้รายงานผู้ป่วยที่เกิดปัญหา acute hemolytic transfusion reaction จาก anti-$Le^a$ ซึ่งทำปฏิกิริยาที่ 37˚C ได้เช่นกัน[13]

เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้ กับการศึกษาของ ศิริณา พงศ์ถิ่นทองงาม และคณะ ในปี พ.ศ. 2544[14] ซึ่งเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วย ระหว่าง STT และ วิธีเจล พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน 27 ราย (79.4%) จากจำนวนทั้งสิ้น 34 ราย ตรวจพบโดย STT 33 ราย (97%) วิธีเจล 28 ราย (82%) ผลบวกไม่สอดคล้องกัน 7 ราย โดยตรวจพบเฉพาะวิธีเจล 1 ราย (anti-E) พบผลบวกเฉพาะ STT อย่างเดียว 6 ราย ประกอบด้วย anti-$P_1$ 1 ราย และ แอนติบอดีระบบ Lewis 5 ราย และสรุปว่า STT ตรวจพบแอนติบอดีได้ดีวิธีเจล และมีความไวมากกว่าในการตรวจหา anti-$P_1$ และ แอนติบอดีระบบ Lewis และรายงานของ อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์ และคณะ[15] ที่ประเมินชุดทดสอบ K-med gel ในการการตรวจกรองแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดง เปรียบเทียบกับ STT ที่อุณหภูมิห้อง และที่ antiglobulin phase พบว่า STT มีความไวมากกว่าวิธี K-med gel ในการตรวจพบ anti-$P_1$ และแอนติบอดีระบบ Lewis พบว่าผลสอดคล้องกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ กฤษณา เอื้อน้อมจิตกุล[16] ที่พบว่า STT และ Gel test มีความไวเหมือนกันในการตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก แต่ STT มีความไวมากกว่าในการตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเฉพาะผู้บริจาคโลหิตภายในโรงพยาบาลขอนแก่น พบความชุกการตรวจพบแอนติบอดี 4.31% การตรวจพบแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต ไม่มีความสัมพันธ์กับอายุและเพศ และแอนติบอดีที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็น naturally occurring antibodies ซึ่งมีโอกาสพบได้ทั้งในเพศชาย และเพศหญิง การศึกษานี้ตรวจพบ anti-D 1 ราย เป็นเพศหญิง อายุ 44 ปี สถานะภาพสมรส หมู่โลหิต A Rh negative ซึ่งจากการสืบค้นประวัติพบว่าแอนติบอดีที่พบเกิดจากการถูกกระตุ้น เนื่องจากการตั้งครรภ์มาก่อน (ลูกหมู่โลหิต A Rh positive)

ความชุกของแอนติบอดีที่ตรวจพบ ในกลุ่มประชากรต่างๆ มีความแตกต่างกัน ขึ้นกับความถี่ของแอนติเจนของหมู่โลหิตในประชากรที่ศึกษา หรือเทคนิคที่นำมาใช้ในการทดสอบ ซึ่งมีความไวที่ต่างกันในการตรวจพบแอนติบอดีแต่ละชนิด ซึ่งแต่ละวิธีไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ทุกชนิด[15] วิธีที่ใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดีต้องสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตที่มีความสำคัญในงานบริการโลหิต ได้ทั้งชนิด IgM และ IgG รวมทั้งข้อดี และข้อเสียของแต่ละวิธีที่นำมาใช้ เช่น วิธีมาตรฐาน คือวิธีหลอดทดลอง มีข้อดีคือทำง่าย สะดวก ผลเชื่อถือได้ น้ำยาแอนติโกลบูลินของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ มีคุณภาพดี ราคาต่ำกว่าต่างประเทศ สามารถตรวจพบแอนติบอดี ชนิด IgM และ IgG ได้ในการทดสอบครั้งเดียว และสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ หรือไม่ชัดเจนด้วยตาเปล่าโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ได้ แต่มีข้อด้อยคือ ต้องระมัดระวังในการอ่านผล ไม่เขย่าแรงเกินไป ผลของปฏิกิริยาไม่คงตัวถ้าเก็บไว้นานจึงต้องอ่านผลในเวลาที่กำหนด ถ้าปริมาณงานมากต้องเสียเวลาในการล้างเซลล์ แต่อาจแก้ไขได้โดยการใช้เครื่องล้างเซลล์อัตโนมัติ ส่วนวิธีเจล ข้อดีคือ สามารถเก็บ แผ่นเจลที่ทดสอบไว้อ่านผลหรือตรวจสอบผลซ้ำได้ระยะเวลาหนึ่ง ไม่ต้องมีขั้นตอนการล้างเซลล์และดูกล้องจุลทรรศน์ ใช้ซีรัมหรือพลาสมาปริมาณน้อย ข้อเสียคือ ราคาแพงกว่าวิธีหลอดทดลอง อีกทั้งการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ต้องใช้แผ่นเจลต่างชนิดกันในการทดสอบ นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมโลหิตให้ผู้ป่วย ถ้าความเข้มข้นของการเตรียมสารละลายเม็ดโลหิตแดงไม่เหมาะสม อาจทำให้เกิดผลลบปลอมหรือผลบวกปลอมได้ และอ่านผลผิดพลาดพลาดได้ ถ้ามี fibrinในซีรัม กรณีที่ผลไม่ชัดเจนต้องทำการทดสอบซ้ำ ทำให้เสียเวลา และค่าใช้จ่ายเพิ่มในการทดสอบ

ความชุกของแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต โรงพยาบาลขอนแก่น จากการศึกษานี้พบว่ามีความชุกต่ำกว่าที่พบในผู้บริจาคโลหิตชาวไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (15.30%)[17] แต่สูงกว่าความชุกในผู้บริจาคโลหิต โรงพยาบาลสงขลานครินทร์[18] และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย[19] ที่พบความชุก ร้อยละ 1.0 และ 0.4 ตามลำดับ อาจเนื่องจากความแตกต่างของกลุ่มประชากร ช่วงเวลาที่ศึกษา เทคนิค และเซลล์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

แอนติบอดีที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้ คือ แอนติบอดีในระบบ Lewis (57.5%) สอดคล้องกับการศึกษาของทะนงศักดิ์ ยีละ และคณะ ซึ่งพบ anti-Lewis มากที่สุด (90%)[18] รองลงคือ anti-$P_1$ (30%) แต่ต่างกับการศึกษาของอมรรัตน์ ร่มพฤกษ์และคณะ ที่พบ anti-$P_1$ มากที่สุดในผู้บริจาคโลหิตชาวไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (70.8%)[17] anti-Lewis และ anti-$P_1$ เป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยในคนไทยซึ่งมีความถี่ของแอนติเจนแตกต่างจากชนผิวขาว (Caucasians) โดยพบการกระจายของแอนติเจน $P_1$ 22.65% ($P_1$ negative 77.35%), Le(a-b-) phenotype 30.87%[20] โอกาสที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนบนผิวเม็ดโลหิตแดง จากการรับโลหิต หรือ antigen like substance จากภายนอกจะมีมากกว่าชนผิวขาว ที่มีความถี่ของ antigen $P_1$ negative และ Le(a-b-) phenotype เพียง 21 และ 6%[20] ตามลำดับ กรณีที่ตรวจพบแอนติบอดีในโลหิตบริจาค จะใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเม็ดโลหิตแดง ส่วนพลาสมาที่มีแอนติบอดีจะคัดแยกทิ้ง เนื่องจากอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรับโลหิตแก่ผู้ป่วยที่มีแอนติเจนจำเพาะกับแอนติบอดีได้ หรือนำพลาสมาที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วมาใช้ประโยชน์ในการทดสอบ red cell typing ถ้ามีคุณสมบัติที่เหมาะสม

สรุปจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า วิธีหลอดทดลองมาตรฐานเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี ในผู้บริจาคโลหิตมากกว่าวิธีเจล โดยเฉพาะกรณีที่ปริมาณงานไม่มากและมีข้อจำกัดเรื่องงบประมาณ แอนติบอดีที่พบส่วนใหญ่เป็น naturally occurring antibody ชนิด IgM โดยเฉพาะ anti-$P_1$ และ Lewis antibodies เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับโลหิตที่เหมาะสม ปลอดภัย ถึงแม้แอนติบอดีกลุ่มนี้จะมีความสำคัญทางคลินิกน้อย แต่หากเกิดปฏิกิริยาที่ 37°C ก็อาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรับโลหิต กรณีให้พลาสมาปริมาณมาก หรือการให้ single donor platelet กับผู้ป่วยที่มีแอนติเจนจำเพาะกับแอนติบอดีในโลหิตบริจาค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเด็ก อย่างไรก็ตามการฝึกอบรมบุคลากรให้ทำการทดสอบและอ่านผลด้วยเทคนิคที่ถูกต้อง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความคุ้มค่า คุ้มทุน ในงานบริการโลหิตต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


1. *ISBT. (2013). BloodGroup Terminology. Cited 2013 Feb 16. Available from :http:// www.isbtweb.org/.*
2. *Bejrachandra S. Clinically significant of blood group antibody. Thai J Hematol Transf Med 2005;4:211-5.*
3. *Saipin J. Blood group antigens and antibodies. Thai J Hematol Transf Med 2008;1:3-5.*
4. *Cooling L. ABO, H and Lewis blood groups and structurally related antigens. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical manual. 16 th ed. Bethesda, MD: AABB 2008;361-75.*
5. *Walker SP. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical Manual. 16 th ed. Bethesda, MD: AABB 2008;465-6.*
6. *Madison College. Immune hemolysis & Complement. Cited 2012 April 1. Available from http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/BloodBank/lectures/complement.htm.*
7. *Caruccio L. Fundamentals of immunology for blood bankers. In: Harmening DM, ed. Modern Blood banking and Transfusion Practices. 5th ed. Philadelphia : F.A. Davis Company, 2005:58-60.*
8. *Saipin J. Blood group antibody detection technique. Thai J Hematol Transf Med 2003;3:225-31.*
9. *DG Gel Neutral, Direction for use. Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain, 2012.*
10. *DG Gel Coombs, Direction for use. Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain, 2012.*
11. *Chandeysson PL, Flye MW, Simpkins SM, Holland PV. Delayed hemolytic transfusion reaction caused by anti-P1 antibody. Transfusion 1981;21:77-82.*
12. *Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, Zeger GD. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-$P_1$ that reacted at 37°C. Transfusion 1998;38:373-7.*
13. *Thakral B, Jain A, Saluja K, Sharma RR, Singh K, Shyam T, Marwaha N. Acute hemolytic transfusion reaction by $Le^a$ alloantibody. Am J Hematol 2006;81:807-8.*
14. *Pongtintongngam S. Comparison of antibody identification by gel Test and conventional tube test. Vajira Med J 2001;45:231-6.*
15. *Romphruk A, Akkahat J, Jaroonsirimaneekul T, Sripara P, Romphruk A, Paupairoj C. Evaluation of K-Med gel in blood grouping and antibody screening tests. J Med Tec Phy Ther 2010;3:252-61.*
16. *Ueanomjitkul K. Comparison study of the manual polybrene, gel test, autovue innova and conventional tube test for antibody screening [A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science (Transfusion science) Faculty of Graduate Studies]. Mahidol University; 2006.*
17. *Romphruk A, Akkahat J, Wanhagij C, Tantanapornkul P, Anuphan T, Pattayaso P. Anti-$P_1$: The most common unexpected antibodies in Northeastern-Thais. J Med Assoc Thai 1999;82:803-7.*

18. Yeela T, Buathong W. Screening and identification of irregular antibodies in blood donors. Songkla Med J 2004;22:89-93.
19. 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.
20. Keokhamphoul C, Urwijitaroon Y, Kongphaly D, Thammavong T. Blood group antigen distribution in Lao blood donors. Immunohematology 2012;28:132-6.

# Unexpected antibodies among blood donors detected by standard tube test and a column gel agglutination test: A study for safe blood transfusion

**Sajika Plungklang[1] and Yupa Urwijitaroon[2 *]**

[1]Blood Bank Centre, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen; [2]Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

***Abstract:*** *Microcolumn gel agglutination technique for red cell serology testing has been implemented worldwide. It is a simplified technical performance assay but has higher cost compared with standard tube test (STT). The aim of this study was to assess the prevalence of red blood cell alloantibodies and compare the performance of STT with a microcolumn gel agglutination test (DG Gel: Diagnostic Grifols, Barcelona, Spain) for screening of red cell antibodies in blood donors of the Khon Kaen Hospital. A total of 929 serum samples from donors were tested. Red blood cell alloantibodies were detected in 40 (4.31%) donors by STT and 15 (1.61%) donors by DG Gel. Concordant results between both techniques were found in 15 donors including 5 anti-$Le^a$; 4 anti-$Mi^a$; 3 anti-$Le^a$+$Le^b$; 1 anti-$Le^b$; 1 anti-D and 1 anti-$Le^b$+$Mi^a$, respectively. Discordant results, which were positive by STT only found in 25 donors. DG Gel failed to detect all of 12 anti-$P_1$; 7 anti-$Le^a$; 4 anti-$Le^a$+$Le^b$ and 2 anti-$Le^b$. This study shows that STT had higher sensitivity than DG Gel in detection of IgM antibodies with a prevalence of 4.31% VS 1.61%. DG Gel had limitations for detection anti-$P_1$ and some Lewis antibodies which commonly found in Thai populations with high prevalence of $P_1$ negative at 77% and Le(a-b-) at 30%. Although these antibodies are considered as minor clinical significant antibodies but by react at 37°C, they may induce transfusion complications if large volume of plasma or single donor platelets are transfused to recipients possess corresponding antigen, especially in children.*

***Keywords :*** ● *Blood donors* ● *Antibody screening* ● *Antibody specificity* ● *Standard tube test* ● *Gel test*

***J Hematol Transfus Med 2014;24:17-23.***