นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาแอนติเจน - แอนติบอดีของหมู่เลือดใน Polyethylene Glycol, LISS และ Saline Medium

อาภาพันธ์ ศรีสรินทร์, วัชรินทร์ เชื้อบุญมี*, สุภาวดี โรจน์พิพัฒน์กุล*, มยุรัตน์ บุญแก้ว, และ จริยา สายพิณ**

*ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก; *นักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์;*
***ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล*

บทคัดย่อ: *เพื่อศึกษาแนวทางที่เป็นไปได้ที่จะใช้ตรวจหาปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีของหมู่เลือดนอกเหนือจากวิธีที่ใช้ประจำ และเป็นแนวทางที่อาจใช้ช่วยแก้ปัญหาในกรณีตรวจหาแอนติบอดีปริมาณต่ำๆ ได้ ผู้วิจัยจึงทดสอบเปรียบเทียบความแรงของปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี ในตัวกลาง (medium) ได้แก่ PEG, saline และ LISS โดยเจือจางซีรัมที่มีแอนติบอดีแต่ละชนิดในตัวกลางดังกล่าวเป็น 2 fold dilution ได้แก่ anti-D, anti-E, anti-Mi^a, anti-Le^a และanti-Le^b จำนวน 12, 10, 7, 7 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ ให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกันในตัวกลางทั้ง 3 ชนิดตามวิธีการเฉพาะสำหรับตัวกลางนั้นๆ และให้เหมาะสมกับชนิดแอนติบอดีนั้นๆ ด้วยเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาดีที่สุด เปรียบเทียบผลคือคะแนน (score) ความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่ม หรือไตเตอร์การแตกของเม็ดเลือดแดง โดย Wilcoxon Signed Ranks Test พบว่า PEG medium ช่วยเสริม anti-D และ anti-E ให้แสดงปฏิกิริยาได้แรงกว่าใน saline medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่ต่างจาก LISS ($p > 0.05$) สำหรับ anti-Le^a และ anti-Le^b :ซึ่งเป็น IgM ให้ความแรงของปฏิกิริยากับ papainized cell ใน PEG มากกว่าใน NSS และ LISS medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p <0.05$) แต่ PEG medium ไม่ช่วยเสริมหรือลดความแรงของปฏิกิริยาของ anti-Mi^a ซึ่งเป็น IgM ที่ทำปฏิกิริยากับ non-papainized cell เมื่อเทียบกับ LISS และ saline ($p > 0.05$) การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่สามารถปรับเปลี่ยนและพัฒนาได้อีกในการวิจัยครั้งต่อๆ ไป*

Key Words : ● *Blood group antigen-antibody reaction* ● *Enhancement medium* ● *Polyethylene glycol medium* ● *LISS medium* ● *Saline medium*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2546;13:209-17.

Polyethylene glycol (PEG) เป็นสารละลายโพลีเมอร์ที่เป็นกลาง และละลายน้ำได้ ซึ่ง Nance SJ และ Garratty G[1] ได้วิจัยพบว่าสามารถช่วยให้เกิดปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแอลบูมิน ทำให้ตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกน้อยลง และทำให้ลดความต้องการที่จะใช้วิธีอื่นๆ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี (enhancement technique)[2]

ได้รับต้นฉบับ 23 มิถุนายน 2546 และให้ตีพิมพ์ 11 สิงหาคม 2546
ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ นางสาวอาภาพันธ์ ศรีสรินทร์ ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศิริราชพยาบาล ถนนพรานนก เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบความแรงของปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี ในตัวกลางที่ใช้กันอยู่เป็นประจำ คือน้ำเกลือ (NSS : saline medium) และ LISS (low ionic salt solution) เทียบกับ PEG ซึ่งใช้เทคนิค indirect antiglobulin test (PEG-IAT) โดยใช้ซีรัมที่มีแอนติบอดีที่ทราบชนิดแล้วและเป็นแอนติบอดีที่พบค่อนข้างบ่อยได้แก่ anti- Mi^a, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-D และ anti-E ให้ทำปฏิกิริยากับ screening cell ซึ่งใช้ในงานประจำ ที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีนั้นๆ ตามลำดับ ความแรงของปฏิกิริยาที่มากกว่าในตัวกลางที่ใช้กับซีรัมที่มาจากคนเดียวกัน ย่อมแสดงถึงความสามารถที่ดีกว่าของตัวกลางชนิดนั้นในการเสริมปฏิกิริยา หรือไวกว่าที่จะตรวจพบแอนติบอดีนั้นๆ

เทคนิค PEG-IAT จึงอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการตรวจหาปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีได้ไวขึ้นอีก โดยเฉพาะกรณีที่มีแอนติบอดีปริมาณต่ำ

วัสดุและวิธีการ

น้ำยา

1. น้ำยา 20% Polyethylene glycol (PEG medium)[2] ประกอบด้วย Polyethylene glycol น้ำหนักโมเลกุล 6,000 (BDH chemical Ltd. Poole, England) 20.0 ก. ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง phosphate buffer pH 7.3 กับ น้ำเกลือ 0.9% ในอัตราส่วน 1:9 โดยชั่ง PEG 20 ก. แล้วเติม PBS ให้ครบ 100 มล. เก็บน้ำยาที่ 4 °ซ (phosphate buffer pH 7.3 ประกอบด้วย น้ำยา A ปริมาตร 16 มล. และ น้ำยา B ปริมาตร 84 มล. น้ำยา A คือ $NaH_2PO_4H_2O$ 22.07 ก. ละลายในน้ำให้ได้ 1 ลิตรและ น้ำยา B คือ Na_2HPO_4 22.70 ก. ที่ละลายในน้ำให้ได้ 1 ลิตรตามลำดับ)

2. น้ำยา low ionic salt solution (LISS medium)[2] เตรียมจาก NaCl 1.75 ก, glycine 18 ก., 0.15 M. KH_2PO_4 11.3 ก. และ 0.15 M. Na_2HPO_4 8.7 ก. เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.7 และใช้ sodium azide 0.5 ก. เป็น preservative เก็บน้ำยาที่ 4 °ซ

3. Normal saline solution (NSS medium) คือ 0.9% NaCl

4. Polyspecific antihuman globulin reagent (Biological Laboratory Ltd; Auckland)

วัสดุ

1. Screening cells ประกอบด้วย
   - 1.1 เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ O, Mi(a+)
   - 1.2 เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ O, C+c+D+E+e+ หรือ S-IAT
   - 1.3 Papainized red cells O, Le(a+b-)+ Le(a-b+) หรือ P+
   - 1.4 Papainized red cells O, Le(a-b-) หรือ P-

2. ตัวอย่างตรวจ คือซีรัมมีแอนติบอดีที่ทราบชนิดแล้วจากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม.มหิดลได้แก่ anti -D จำนวน 12 ตัวอย่าง anti -E จำนวน 10 ตัวอย่าง anti -Le^a จำนวน 7 ตัวอย่าง anti-Le^b จำนวน 5 ตัวอย่าง และ anti-Mi^a จำนวน 7 ตัวอย่าง

3. ในการทดสอบทั้งหมดใช้ไปเปตต์อัตโนมัติ : ปริมาตร 50 ไมโครลิตร คือ 1 หยด

วิธีการทดลอง

วิธีการเปรียบเทียบความไวของตัวกลางทั้ง 3 ชนิดทำโดย

1. เจือจางซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีแต่ละรายด้วยน้ำเกลือ (NSS), LISS และ PEG เป็น 2 fold dilution 1:2 - 1:1024 เจือจางโดยใช้ไปเปตต์อัตโนมัติ

2. เติมเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกับชนิดแอนติบอดีนั้นๆ ในแต่ละหลอด ซีรัมที่มี anti-D หรือ anti-E ใช้ S-IAT cell ซึ่งมีแอนติเจน D และ E, anti -Mi^a ใช้เซลล์ O, Mi(a+) และ anti-Le^a, anti-Le^b ใช้ papainized cell ดังรายละเอียดวิธีทดสอบในข้อ 2.1 -2.3 และ/หรือดูสรุปวิธีทดสอบข้อ 2.1-2.3 ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Methods in brief from 2.1-2.3

Medium	Anti-D, anti-E	Anti- Mi^a	Anti-Le^a ,anti-Le^b**
2.1 Saline*	RT, 37˚C 45‘, IAT	RT 5‘, RT 60‘	37˚C, 15‘
2.2 LISS	37˚C 15‘, IAT	37˚C 15‘, IAT	37˚C, 15‘
2.3 PEG	37˚C 15‘, IAT	37˚C 15‘, IAT	37˚C, 15‘

‘ Minutes

* Conventional techniques for antibody screening test at Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine. Siriraj Hospital

** Hemolysis was detected from antigen-antibody reaction

2.1 วิธีที่ใช้ saline medium สำหรับ anti-D หรือ anti-E ใช้ Indirect antiglobulin test คือ เติมเม็ดเลือดแดง (3% ใน NSS) 1 หยด ลงในหลอดที่มีซีรัม 2 หยด เขย่าผสม ปั่นดูการจับกลุ่ม แล้วอุ่นที่ 37˚ซ 45 นาที ปั่นอ่านผลแล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง สุดท้ายสลัดแห้งเติมน้ำยา antihuman globulin (AHG) ปั่นดูการจับกลุ่มและให้ score สำหรับ anti-Mi^a วางส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 และ 60 นาที ดูการจับกลุ่มและบันทึกความแรงของปฏิกิริยา และสำหรับ anti-Le^a, anti-Le^b ทำ 2 ชุดคือชุดที่เติม Le(a+b-)+Le(a-b+)และชุดที่เติม Le(a-b-) เพื่อเป็น negative control อุ่นส่วนผสมที่ 37˚ซ 45 นาที ปั่นดูการแตกของเม็ดเลือดแดงและบันทึกไตเตอร์สุดท้ายที่ให้ผลบวก

2.2 วิธีที่ใช้ LISS medium ล้าง screen cell ซึ่งอยู่ในน้ำยา Alsever ด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้งได้ packed cell แล้วเติม LISS ให้ได้ 2-3% หยด 2 หยด ลงในหลอดทดสอบที่มีซีรัม 2 หยด (ที่เจือจางด้วย LISS) ทั้งชุดของ anti-D, anti-E, anti-Mi^a เขย่าผสมแล้วอุ่นที่ 37˚ซ 15 นาที ปั่นดูการจับกลุ่ม แล้วล้างเม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายสลัดแห้งเติมน้ำยา AHG ปั่นดู score การจับกลุ่ม แต่สำหรับ anti-Le^a และ anti-Le^b รายงานเฉพาะผลการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 37˚ซ 15 นาที

2.3 วิธีที่ใช้ 20% PEG medium[2] ใช้ indirect antiglobulin technique (PEG-IAT) คือ ในแต่ละหลอดที่มีซีรัม 2 หยดของ anti-D, anti-E และ anti-Mi^a เติมเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกัน 1 หยดทุกหลอด และเติม 20% PEG ใน PBS 4 หยด อุ่นที่ 37˚ซ 15 นาที เขย่าผสมให้เข้ากันดี ไม่ปั่นอ่านผล แต่ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 4 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเทน้ำเกลือทิ้งซับแห้งเติม AHG แล้วปั่นดูปฏิกิริยา สำหรับ anti-Le^a และ anti-Le^b รายงานเฉพาะผลการแตกของเม็ดเลือดแดงที่ 37˚ซ 15 นาที

การอ่านผล anti-D, anti-E, anti-Mi^a บันทึกคะแนน (score) ความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่ม สำหรับ anti-Le^a และ anti-Le^b ดูปฏิกิริยาจากการแตกของเม็ดเลือดแดง บันทึกไตเตอร์สุดท้ายที่ให้ผลบวก และมีรายละเอียดวิธีการให้คะแนนความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่ม[2] ดังตารางที่ 2 และตัวอย่างวิธีให้คะแนนในตารางที่ 3

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยสถิติ non-parametric: Wilcoxon Sign Ranks test ใน SPSS for Windows[10]

ผลการศึกษา

ตารางที่ 3, 4 และ 5 แสดงคะแนนความแรงของปฏิกิริยาที่ได้จากวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ของ anti-D และ anti-E, anti-Le^a และ anti -Le^b และ anti-Mi^a ใน saline, LISS , และ PEG medium จากซีรัมจำนวน 12, 10, 7, 5 และ 7 รายตามลำดับ การวิเคราะห์ผลการทดลองเหล่านี้ทำโดยเปรียบเทียบข้อมูลความแรงของ

ตารางที่ 2 Interpretation of agglutination reaction[2] : Strength of reaction, Score and Appearance

Strength of reaction	Score value	Appearance
4+	12	A single agglutination. No free rbcs detected.
3-1/2+	11	
3+	10	Strong reaction. A number of large agglutinates.
2-1/2++	9	
2+	8	Large agglutinates in a sea of smaller clumps, no free RBCs.
2+w	7	Many agglutinates-medium and small clumps, no free RBCs.
1-1/2+	6	Many medium and small agglutinates, and free RBCs in the back ground.
1+	5	Many small agglutinates and a back ground of free RBCs.
1+w.	4	Many very small agglutinates with a lot of free RBCs.
1/2+ or -	3	Weak granularity in the RBC Suspension. A few macroscopic agglutinates but numerous agglutinates microscopically.
Trace or micro	2	Appear negative macroscopically. A few agglutinates of 6-8 RBCs in most fields.
Question-able	1	Rare agglutinates observed microscopically.
0	0	An even RBC suspension. No agglutinates detected.

ตารางที่ 3 Examples of antibody titers and scores[2]

		Reciprocal of serum dilution										Titers *	Score
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
Sample	Strength	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	±	±	0	64 (256)	
1	Score	10	10	10	8	8	8	5	3	2	0		64
Sample	Strength	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	±	0	128 (256)	
2	Score	12	12	12	10	10	8	8	5	3	0		80
Sample	Strength	1+	1+	1+	1+	±	±	±	±	±	0	8 (256)	
3	Score	5	5	5	5	3	3	3	2	2	0		33

* In prenatal testing or reagent evaluation, the titer is usually determined from the highest dilution of serum that gives a reaction ≥ 1 + (score 5). This may differ significantly from titration end point (shown in parenthesis), as with the reaction of an antibody with high titer, low avidity characteristics, manifested by Sample # 3

ตารางที่ 4 Scores of anti-D and anti-E from 12 diluted serum tested by indirect antiglobulin test, using saline, LISS and PEG mediums.

Serum sample number	Anti- D scores			Serum sample number	Anti- E scores		
	Saline IAT	LISS IAT	PEG IAT		Saline IAT	LISS IAT	PEG IAT
1	120	123	128	13	56	77	86
2	79	81	98	14	58	67	82
3	91	88	97	15	59	69	79
4	94	86	97	16	61	66	72
5	54	69	86	17	61	66	72
6	68	37	70	18	72	97	86
7	107	108	93	19	85	71	80
8	48	77	77	20	51	48	48
9	64	87	87	21	35	37	43
10	77	78	68	22	23	45	14
11	68	40	65	-	-	-	-
12	61	68	47	-	-	-	-

ตารางที่ 5 Scores of anti-Le^a and anti-Le^b from 7 and 5 diluted serum tested against papainized cell, using saline, LISS and PEG mediums. The last titer that showed hemolysis were reported.

Serum sample number	Anti- Le^a scores*			Serum sample number	Anti- Le^b scores*		
	Saline 37°C 45'	LISS 37°C 15'	PEG 37°C 15'		Saline 37°C 45'	LISS 37°C 15'	PEG 37°C 15'
1	8	32	512	8	32	16	256
2	4	4	512	9	4	16	256
3	8	4	128	10	16	16	64
4	16	4	32	11	8	8	64
5	16	4	32	12	8	8	64
6	32	16	32	-	-	-	-
7	16	4	32	-	-	-	-

*Le(a-b-) cell showed negative reaction in every serum samples

ตารางที่ 6 Scores of anti-Mi[a] from 7 diluted serum, tested against P_1Mi[a] screen cell in saline, LISS and PEG medium.

Serum sample number	Score from anti- Mia				
	Saline medium		LISS medium		PEG medium
	RT 5‘	RT 60‘	37°C 15‘	IAT	IAT
1	69	75	70	90	*87*
2	51	53	30	42	*82*
3	23	82	36	73	*78*
4	70	80	47	59	*64*
5	60	60	0	31	*60*
6	69	62	47	30	*46*
7	107	110	84	90	*39*

ปฏิกิริยาเป็นคู่ๆ ระหว่าง PEG กับ saline, PEG กับ LISS ของแอนติบอดีทั้ง 5 ชนิด โดยสถิติ non-parametric : Wilcoxon Sign Ranks test พบว่า PEG medium ช่วยเสริม anti-D และ anti-E ให้แสดงปฏิกิริยาการจับกลุ่มได้แรงกว่า saline medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่แรงกว่า LISS medium ($p > 0.05$) สำหรับ anti-Le[a] และ anti-Le[b] นั้น PEG medium ช่วยเสริมปฏิกิริยาการแตกของเม็ดเลือดแดง (papainized cell) ให้แรงกว่าทั้งใน saline และ LISS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วน anti-Mi[a] พบว่า PEG ไม่ช่วยเสริมปฏิกิริยาการจับกลุ่มให้แรงขึ้นกว่าใน saline และ LISS ($p > 0.05$)

วิจารณ์

โปรตีนที่เป็นตัวกลางที่ละลายน้ำ (colloidal media) บางชนิด เช่น 22% albumin, polyethyleneglycol (PEG), polybrene, polyvinylpyrrolidone (PVP) และ protamine จะช่วยเร่งปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี ช่วยให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มได้เร็วขึ้น เมื่อมีโมเลกุล IgG specific antibody สำหรับ PEG มีสูตรโมเลกุลคือ $H(OCH_2CH_2)_n OH$ เป็น linear polymer นิยมใช้เป็นสารหล่อลื่นในโรงงานอุตสาหกรรม เป็นสาร low toxicity ไม่ทำให้ immune complex สลายตัว คงทนเก็บรักษาง่าย[6] ในปี 1987 Nance SJ and Garratty G[1] ได้กล่าวถึงกลไกในการช่วยเร่งปฏิกิริยาของ polyethyleneglycol (PEG) ว่าโมเลกุลที่เป็น linear polymer นี้เมื่อละลายน้ำจะกินที่หรือแทนที่ในช่องว่างของ reactive solution ทำให้เพิ่มความเข้มข้นของ reactants คือโมเลกุลของแอนติบอดีที่มีอยู่เดิม ทำให้แอนติบอดีมีโอกาสสัมผัสกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบ่อยขึ้น เกิด complex formation คือ IgG sensitized cell เร็วขึ้นและทำให้มีโอกาสเกาะกลุ่มกันมากขึ้นด้วย มีรายงานว่า PEG เพิ่มความแรงของปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดีกว่าแอลบูมิน, LISS[3] และ polybrene[4] ในการตรวจหาแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นน้อย โดยเติมลงในหลอดทดลองในการทำ antibody screening test และ compatibility test ใน antiglobulin crossmatch[3,4] การใช้ PEG ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะมาก มีผลบวกปลอมหรือ nonspecific reaction น้อย[4,5] และต่างจากการทดสอบทั่วไปคือไม่ปั่นเพื่อดูการจับกลุ่มหลังอุ่นที่ 37°ซ แต่อ่านปฏิกิริยาหลังจากทำ IAT

การศึกษานี้จึงได้ทดลองใช้ PEG กับ anti-D, anti-

E, anti-Le^a, anti-Le^b และ anti-Mi^a พบว่าให้ผลสอดคล้องกันกับรายงานดังกล่าวคือ anti-D และ anti-E ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็น IgG antibody ให้ score สูงกว่า ทั้ง NSS และ LISS medium ในร้อยละ 50 ของตัวอย่าง (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามผลที่ได้จาก PEG ต่างจาก saline medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ขณะที่ไม่ต่างจาก LISS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กรณีนี้มีข้อสังเกตคือการเจือจางซีรัมที่ทดสอบเป็น 2 fold dilution ด้วย medium ที่ใช้ทดสอบจะทำให้โปรตีนในซีรัมลดลง น่าจะมีผลต่อปฏิกิริยาแอนติเจนแอนติบอดีโดยเฉพาะ IgG ซึ่งเสริมปฏิกิริยาได้ด้วยโปรตีนคือแอลบูมิน[1-5] ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเจือจางซีรัมด้วย NSS ที่มีแอลบูมิน 2-6% หรือ AB serum เพื่อได้สภาพซีรัมจริงที่มีแอนติบอดีเจือจางลงเป็นลำดับก็จะได้ผลการทดลองที่ชัดเจนยิ่งขึ้น แทนการเจือจางด้วยตัวกลาง NSS, LISS และ PEG ดังวิธีการทดลองข้อ 1

สำหรับ anti-Le^a และ anti-Le^b ให้ความแรงของปฏิกิริยา ใน PEG สูงกว่าใน NSS และ LISS medium (ตารางที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) น่าจะเกิดจากการสาเหตุ 2 ประการ ประการแรกคือ การใช้ papainized cell ซึ่งผิวเม็ดเลือดแดงถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ papain มาก่อน จุดนี้เป็นจุดที่ได้ปรับเปลี่ยนไปจากวิธีอ้างอิงใน AABB Technical manual[2, 11] ผลคือปฏิกิริยาแรงขึ้นใน PEG medium อาจเกิดจากการเสริมกันระหว่าง กลไกของ PEG กับเอ็นไซม์ กลไกของ PEG คือโมเลกุล PEG แทนที่ในช่องว่างของ reactive solution ทำให้แอนติบอดีมีโอกาสเกาะกับแอนติเจนมากขึ้น ทั้งนี้แอนติบอดีเป็น IgM ซึ่งหากไม่ใช้ papainized cell ปฏิกิริยาอาจไม่ชัดเจนเช่นนี้ นอกจากนี้สาเหตุที่อาจทำให้ไตเตอร์สูงขึ้นมากประการที่ 2 คือ การเกิดผลบวกปลอมซึ่งเป็นข้อควรระวังในการใช้เอ็นไซม์ ในการศึกษานี้ได้ใช้ เซลล์ Le(a-b-) papainized cell เป็น negative control ผสมกับซีรัมที่มี anti-Lewis ทำคู่กันกับเซลล์ Le(a+b-)+Le(a-b+) ผสมกับซีรัมตัวอย่างเดียวกันได้ผลลบทุกตัวอย่างแสดงว่า PEG medium ในซีรัมที่มี anti-Lewis ไม่ทำให้ Le(a-b-) papainized cell เกิดผลบวกปลอม อย่างไรก็ตามยังไม่แน่ใจว่า PEG medium ในซีรัมที่ไม่มี anti-Lewis จะทำให้ Le(a+b-)+Le(a-b+) papainized cell เกิดผลบวกปลอมหรือไม่ ซึ่งอาจมีผู้สนใจศึกษาต่อไปจากการศึกษาเบื้องต้นนี้

Anti-Mi^a เป็น IgM เช่นกัน พบว่า PEG ไม่ช่วยเพิ่มความแรงของปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับ saline และ LISS medium ตรงกับทฤษฎีที่ว่า PEG ช่วยเสริมปฏิกิริยาของ IgG ได้ดี ไม่ช่วยเสริมหรือลดปฏิกิริยาของ IgM[11] นอกจากนี้ไม่สามารถใช้ papainized cell กับ anti-Mi^a ได้เนื่องจากแอนติเจน Mi^a ถูกทำลายด้วยเอ็นไซม์[2] เห็นได้จากผลความแรงของปฏิกิริยาไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง medium ทุกชนิด ($p > 0.05$)

การที่ PEG ช่วยให้เห็นปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดีแรงขึ้นจาก score ที่มากขึ้น เป็นแนวทางที่พอจะบอกได้ว่า น่าจะตรวจพบ weak antibody ของระบบนั้นๆ ในซีรัมผู้ป่วยได้ดีขึ้น Slater JL[9] ได้วิจัยเปรียบเทียบ PEG-IAT technique กับ LISS technique พบว่าใน routine compatibility test สามารถตรวจพบแอนติบอดีจาก 5 ตัวอย่างตรวจที่ไม่สามารถพบโดย LISS ได้แก่ 2 anti-Fy^a, 1 anti-c, 1 anti-Jk^b และ 1 anti-S ต่อมา Barrett VJ[12] ได้ศึกษาเปรียบเทียบ PEG กับ LISS เช่นกันพบว่า scores ของแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก ในวิธีที่ใช้ PEG มีค่าเฉลี่ย scores มากกว่า LISS และ albumin indirect antiglobulin test และได้ใช้ PEG แทน LISS ในงานประจำในเวลา 1 ปี โดยไม่มีรายงาน acute และ anamnestic HTRs ในการให้เลือด 6,353 ราย เป็นการสนับสนุนข้อสรุปที่ว่าโดยทั่วไป PEG ไม่ทำให้เกิด nonspecific reaction มีประสิทธิภาพในการตรวจหา weak antibodies ได้ดีกว่าแอลบูมิน LISS และ polybrene[4,5] ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับแอนติบอดี Kell[6,12] เช่นที่พบในการใช้ polybrene และไม่จำเป็นต้องใช้เอ็นไซม์[6] ซึ่งเป็นการศึกษาในต่างประเทศ

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองใช้เบื้องต้นในสภาวะของเราที่อาจจะได้ศึกษาต่อไป นอกจากนี้ มีข้อควรระวังคือ PEG อาจเสริมปฏิกิริยาของ warm auto-antibody ในการหาชนิด alloantibodies ขณะที่มี warm auto-antibody อยู่ด้วย และมีข้อสังเกตคือหลังจากอุ่นส่วนผสมของเซลล์กับซีรัมที่ 37 ํซ ใน PEG แล้วไม่ต้องปั่น เพราะจะเกิด nonspecific aggregates ที่ไม่กระจายออกอีก แต่สามารถล้างเซลล์ 3 ครั้งได้ทันที เพื่อหยด antihuman globulin reagent แล้วจึงปั่นอ่านผลต่อไป[11]

สรุป

จากการศึกษานี้แสดงว่าวิธี PEG medium ช่วยเสริมปฏิกิริยาของแอนติบอดีโดยเฉพาะ IgG เช่น anti-D, anti-E ได้ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อใช้คู่กับ papainized cell จะช่วยเสริมปฏิกิริยา anti-Le^a, anti-Le^b ได้ แม้แอนติบอดีเป็น IgM ขณะเดียวกัน PEG medium ไม่ช่วยเสริมปฏิกิริยาของ IgM anti-Mi^a ซึ่งแอนติเจนถูกทำลายด้วยเอ็นไซม์จึงไม่สามารถใช้ papainized Mi^a cell ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงขั้นต้น ที่อาจเป็นแนวทางต่อไป เช่นการทดลองใช้ตัวอย่างตรวจที่ไม่มีแอนติบอดีเหล่านี้ใน PEG medium เพื่อขจัดความสงสัยเรื่องผลบวกปลอมในการใช้เอ็นไซม์ และสามารถปรับเทคนิควิธีทดลองได้อีกในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นซึ่งอาจพบปัญหาที่พึงระวังได้อีก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีต่างๆ และน้ำยา (reagent red cell) สำหรับการสุ่มหาแอนติบอดีเพื่อใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. *Nance SJ, Garratty G. A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. Am J Clin Pathol 1987;87:633-5.*
2. *Walker RH, ed. Technical Manual, 11th ed, American Association of Blood Banks. Bethesda, 1993 p.319-20, 612, 653, 640*
3. *Martin S. Fundamentals of Immuno-hematology for Blood Bankers. In: Harmening DM, editor. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 3rd ed. Philadelphia: FA Davis Company, 1994:43-68.*
4. *Turgeon ML. Fundamentals of Immunohematology Theory and Technique, 2nd edition. Baltimore: Williams &Wilkins 1995:73.*
5. *Lewis VN, Martin S. Fundamentals of Immuno-hematology for Blood Bankers. In: Harmening DM, editor. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 4th ed. Philadelphia: FA Davis Company, 1999:36-70.*
6. *Wenz B, Apuzzo J. Polyethylene glycol improves the indirect antiglobulin test. Transfusion 1989;29:218-20.*
7. *Wenz B, Apuzzo J. Evaluation of the polyethylene glycol-potentiated indirect antiglobulin test. Transfusion 1990;30:318-21.*
8. *Shirey RS, Boyd JS, Ness PM. Polyethylene glycol versus Low Ionic Strength Solution in pretransfusion Testing : a blinded comparison study. Transfusion 1994;34:368-70*
9. *Slater JL. Evaluation of the Polyethyleneglycol-indirect antiglobulin test for routine compatibility testing. Transfusion 1989;29:686-8.*
10. *สุวิชาน มนแพวงศานนท์. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS for Windows. บริษัทซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด (มหาชน). กรุงเทพ, 2545:185-97.*
11. *Vengeline-Tyler V, ed. Technical Manual, 13th ed, American Association of Blood Banks. Bethesda, 1999; p. 257-8, 409.*
12. *Barret VJ, Stubbs JR, Stuardi A, Hollis A, Clear L. Analysis of the routine use of polyethylene glycol (PEG) as an enhancement medium. Immunohematology 1995;11:11-3.*
13. *http://www.redcross.org/pubs/immuno/toc11-1.html #Analysis of the routine use*

Comparison of Blood Group Antigen-Antibody Reaction Using Polyethylene Glycol, LISS and Saline Medium: A Preliminary Study

Apapan Srisarin, Wajarin Shuabunmee*, Suphavadee Rojpipatgul*, Mayurat Boonkaew, and Jariya Saipin**

*Department of Clinical Microscopy; *Medical technologist student, Faculty of Medical Technology; **Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine, Mahidol University*

Abstract: *To find an alternative problem solving for some low titer antibodies. The comparison of blood group antigen-antibody reaction in 3 different mediums: polyethylene glycol (PEG), LISS and NSS were studied. Known serum samples of 12 anti-D, 10 anti-E, 7 anti-Le^a, 7 anti-Le^b and 5 anti-Mi^a were diluted in PEG, LISS and NSS. Each of the dilutions was tested with the screening cells suspended in the 3 mediums respectively. The scores or titer obtained from techniques using PEG medium were compared with those from the conventional methods, suitable for each type of antibodies, using LISS and NSS mediums. The results evaluated by Wilcoxon Signed Ranks test showed that PEG medium did better in enhancing antigen-antibody of anti-D and anti-E when compared with saline medium ($p < 0.05$) but not different from LISS ($p > 0.05$). PEG also enhanced anti-Le^a, anti-Le^b when papainized cells were used. The results were also statistically significant different ($p < 0.05$) when compared with the couple of sera and cells reacted in LISS and saline medium. Anti-Mi^a was not enhanced by PEG when compared with the 2 mediums ($p > 0.05$). Some aspects ofsome techniques in this preliminary study might be improved in further studies.*

Key Words : ● *Blood group antigen-antibody reaction* ● *Enhancement medium* ● *Polyethylene glycol medium* ● *LISS medium* ● *Saline medium*

Thai J Hematol Transf Med 2003;13:209-17.

ขอให้การเงินเดินคล่อง

ขอให้การเงินเดินคล่องทั้งสองฝ่าย
คือทางจ่ายทางรับไม่สับสน
เวลาจ่ายจ่ายได้ทันใจคน
เวลาตนรับรับได้ในฉับพลัน
เมื่อการเงินเดินคล่องต้องประหยัด
จ่ายทุกนัดนึกไว้มิใช่ฝัน
รับทุกทีมีจริงทุกสิ่งอัน
ข้อสำคัญ "เงินดี" ที่เหลือเอง

หมายเหตุ รายรับ รายจ่าย เพื่อปัจจุบัน รายเหลือ เพื่ออนาคต

หลวงตาวัดบวรฯ