บทความฟื้นวิชา

เทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต

จริยา สายพิณ

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบคุณสมบัติของ screening cells ที่ควรใช้ในการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต
2. เพื่อให้เกิดความเข้าใจ คุณสมบัติของแอนติบอดี และสามารถแปลผลการตรวจได้อย่างถูกต้อง
3. เพื่อให้สามารถเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก

การตรวจหาแอนติบอดีของหมู่โลหิต เป็นการตรวจหา unexpected antibodies ซึ่งเป็น แอนติบอดีของหมู่โลหิตระบบต่างๆ นอกเหนือจาก anti-A และ anti-B unexpected antibodies เหล่านี้ได้แก่ แอนติบอดีในระบบ Lewis, P, MNSs, Rh, Kidd, Duffy เป็นต้น ซึ่งพบได้ร้อยละ 0.3-2[1,2] ขึ้นกับเทคนิคการตรวจและกลุ่มประชากรที่ศึกษา unexpected antibodies ส่วนมากเป็น alloantibody คือเป็นแอนติบอดีที่ผู้สร้างไม่มีแอนติเจนชนิดนั้น หรืออาจเป็น autoantibody คือแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของผู้สร้างเอง unexpected alloantibody แบ่งเป็นชนิด immune type ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของเม็ดเลือดแดง จากการได้รับเลือด หรือการตั้งครรภ์ ได้แก่ แอนติบอดี ในระบบ Rh, Kidd, Duffy เป็นต้น และ non-red cell immune type หรือที่เรียกว่า naturally occurring antibody เนื่องจากเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ไม่ได้ถูกกระตุ้นจากเม็ดเลือดแดง ได้แก่ แอนติบอดี ในระบบ Lewis เป็นต้น[3]

การตรวจหาแอนติบอดีของหมู่โลหิต นอกจากใช้ตรวจแอนติบอดีในผู้บริจาคแล้วยัง เป็นส่วนหนึ่งของการตรวจความเข้ากันได้ของเลือด (pretransfusion testing) ซึ่งประกอบด้วยการหาหมู่เลือดระบบ ABO, Rh และการทำ crossmatching ในผู้ป่วย กรณีที่มีการตรวจพบแอนติบอดี ต้องตรวจหาชนิดของแอนติบอดีและเลือกเลือดที่ไม่มีแอนติเจนชนิดนั้นมา crossmatch ให้ผู้ป่วยต่อไป

ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดี ขึ้นกับความสามารถในการทำให้เกิด hemolytic disease of the new born, hemolytic transfusion reaction หรือทำให้เม็ดเลือดแดงที่ให้แก่ผู้ป่วยมีอายุสั้นกว่าปกติ แอนติบอดีเหล่านี้มักทำปฏิกิริยาที่ 37˚C สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี saline indirect antiglobulin test (IAT) จากข้อมูลการศึกษาจำนวนมาก[1,4-15] พบว่าในกลุ่ม cold - reactive antibodies ตัวอย่างเช่น anti-A_1, anti-I, anti-IH, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P_1, anti-M, anti-N เป็นต้น ที่ไม่ทำปฏิกิริยาที่ 37˚C เม็ดเลือดแดง

ได้รับต้นฉบับ 23 มิถุนายน 2546 และให้ตีพิมพ์ 11 สิงหาคม 2546
ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ นางสาวจริยา สายพิณ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพรานนก เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

ที่มีแอนติเจนดังกล่าว จะไม่ถูกทำลายในร่างกายผู้ป่วย จากข้อมูลข้างต้นไม่ได้หมายความว่า แอนติบอดีทุกชนิดที่กล่าวข้างต้นไม่มีความสำคัญทางคลินิก แต่หมายความว่า ถ้าแอนติบอดีใดสามารถจับกับเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิ 37˚C ได้ และ/หรือ ตรวจพบได้ด้วยวิธี IAT แอนติบอดีเหล่านั้นถือว่ามีความสำคัญทางคลินิก ไม่ได้ถือชนิดของแอนติบอดีเป็นสำคัญ[16]

Screening Cells[17]

การตรวจหาแอนติบอดี ทำโดยการนำซีรัมหรือพลาสมา มาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่เรียกว่า screening cells ซึ่งเตรียมจากเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตหมู่โอ ที่มีแอนติเจนของหมู่เลือดระบบต่างๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ D, C, E, c, e, M, N, S, s, P_1, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a และ Jk^b แต่ละ Lot. ของ screening cells จะมี antigen profile แสดงแอนติเจนต่างๆ ของแต่ละคนที่เป็น screening cells ซึ่งชุดของ screening cells มักประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง 2 ขวด จากผู้บริจาค 2 คน เพื่อให้มีแอนติเจนครบตามที่กำหนดไว้

Ideal screening cells จากแต่ละผู้บริจาคที่นำมาใช้ควรเป็นเซลล์ชนิด homozygous เพราะจะมีแอนติเจนเป็น 2 เท่าของเซลล์ชนิด heterozygous แอนติบอดีหลายชนิด เช่น แอนติบอดีของระบบ Kidd, Duffy และ MNSs มี dosage effect ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับ homozygous cells แรงกว่า heterozygous cells ดังนั้นซีรั่มที่มีแอนติเจนอย่างอ่อนๆ จึงอาจตรวจไม่พบถ้าใช้ screening cells ที่เป็น heterozygous cells

Screening cells สำหรับตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วย ไม่ควรนำมารวมกันถ้าเตรียมจากผู้บริจาคคนละคน เพราะจะทำให้ความไวในการตรวจลดลง ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีระดับต่ำได้ เมื่อให้เลือดที่มีแอนติเจนตรงกันจะทำให้เกิด secondary immune response และมีการทำลายของเม็ดเลือดแดงที่ให้เข้าไป[17] แต่ในกรณีตรวจหาแอนติบอดี ในผู้บริจาคโลหิต อาจใช้ screening cells ที่รวมจากผู้บริจาค 2 คน เพื่อให้มีแอนติเจนครบ ถึงแม้ว่าจะมีความไวน้อยลงไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีระดับต่ำได้ แต่ในกรณีนี้พบว่าไม่เป็นอันตรายต่อผู้รับ เนื่องจากแอนติบอดีจากผู้บริจาคจะถูกเจือจางด้วยพลาสมาในร่างกายของผู้รับเอง[18]

เทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต[19]

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีมีหลายวิธี เช่น Saline IAT, Enzyme test, Polybrene เป็นต้น การเลือกวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี มีหลักการในการเลือกดังนี้

1. ควรเป็นวิธีที่ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดี
2. ควรเป็นวิธีที่ตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกได้น้อย
3. เป็นวิธีไม่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจไม่นาน

Indirect Antiglobulin Test (IAT)[20]

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง โดย incubate ซีรัมหรือพลาสมากับเม็ดเลือดแดง ที่ 37˚C เพื่อให้แอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน จากนั้นล้างเอาแอนติบอดีที่ไม่ได้เกาะกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงออกหยด anti human globulin (AHG) reagent ซึ่งเป็น reagent ที่มีแอนติบอดีต่อแอนติบอดีชนิด Ig G บางชนิดอาจมีแอนติบอดีต่อคอมพลีเมนท์รวมอยู่ด้วย ทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติบอดีชนิด Ig G หรือมีคอมพลีเมนท์เกาะอยู่เกิดการจับกลุ่มให้มองเห็นได้ ถ้ามีการจับกลุ่มเกิดขึ้นแสดงว่ามีแอนติบอดี ในซีรัมที่จำเพาะกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง IAT ใช้ในการตรวจ

1. Crossmatching เพื่อตรวจดูปฏิกิริยา ระหว่างเม็ดเลือดแดงของ donor กับซีรัมของผู้ป่วย
2. Antibody screening เพื่อตรวจหาแอนติบอดีของหมู่โลหิตระบบต่างๆ
3. Antibody identification เพื่อตรวจหาชนิดของแอนติบอดี

4. Blood group phenotyping เพื่อตรวจแอนติเจนของหมู่โลหิตระบบต่างๆ ที่ known antibody ที่ใช้ตรวจเป็นชนิด IgG

วิธีการ indirect antiglobulin test มีขั้นตอนดังนี้[17]

1. Label หลอดทดลอง
2. หยดซีรัมหลอดละ 2 หยด
3. หยด screening cells หลอดละ 1 หยด
4. ปั่นอ่านผล บันทึกผล โดยดูการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และการจับกลุ่ม (agglutination)
5. Incubate ที่ 37˚C นาน 15-30 นาที ขึ้นกับ enhancement reagent ที่ใช้ ขั้นตอนนี้เรียก sensitization phase
6. ปั่นอ่านผลดูการแตกของเม็ดเลือดแดง และการจับกลุ่ม บันทึกผล
7. ปั่นล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.8% น้ำเกลือ เพื่อล้างแอนติบอดี ที่ไม่ได้เกาะบนเม็ดเลือดแดงออกให้หมด
8. หยด anti human globulin reagent (AHG) 2 หยด ในแต่ละหลอด
9. ปั่นอ่านผล ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ให้ตรวจสอบโดยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล
10. กรณีที่ผลการตรวจให้ผลลบ หยด Coombs control cells 1 หยด ปั่นอ่านผลอีกครั้ง ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แสดงว่าขั้นตอนการล้างไม่ถูกต้อง ลืมหยด AHG reagent หรือ AHG reagent ไม่มีคุณภาพ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้น

Enzyme technique[21]

การย่อยเม็ดเลือดแดงด้วยเอ็นไซม์ เช่น trypsin, bromelin, ficin และ papain จะช่วยเร่งปฏิกิริยาของหมู่เลือดบางระบบ ได้แก่ Rh. Kidd, Lewis และ P แต่จะยับยั้งปฏิกิริยาของหมู่เลือดบางระบบ ได้แก่ Duffy, MNSs เนื่องจากแอนติเจนถูกทำลายจากการย่อยของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์ที่ใช้ในงานธนาคารเลือดดังกล่าวข้างต้น มีคุณสมบัติเป็น proteolytic enzyme จะลดประจุลบที่ผิวเม็ดเลือดแดง โดยย่อย polypeptide ตรงโมเลกุลของ sialic acid ซึ่งมีประจุลบ เมื่อประจุลบลดลง แรงผลักระหว่างเม็ดเลือดแดงก็จะน้อยลง ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์แคบลง แอนติบอดีที่เป็น IgG สามารถจับกับเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า 1 เซลล์ จึงทำให้เกิดการจับกลุ่มมองเห็นได้โดยไม่ต้องทำ IAT

Enzyme technique แบ่งเป็น

1. One-stage enzyme technique หยดเอ็นไซม์ร่วมไปกับเม็ดเลือดแดงและซีรัม เนื่องจากเอ็นไซม์เหล่านี้เป็น proteolytic enzyme สามารถย่อยแอนติบอดีในซีรัมได้ จึงควรหยดเม็ดเลือดแดงกับซีรัมผสมกันก่อนแล้วจึงหยดเอ็นไซม์ตาม method 3.6.5 AABB Technical Manual
2. Two-stage enzyme technique ย่อยเม็ดเลือดแดงก่อนด้วยเอ็นไซม์แล้วจึงนำไปหยดกับซีรัม วิธีการนี้ใช้มากกว่าวิธีแรกเนื่องจากมีความไวมากกว่าเอ็นไซม์แต่ละ Lot. ก่อนนำมาย่อยเม็ดเลือดแดง ต้องทดสอบหาความเข้มข้นและหาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเม็ดเลือดแดงทุกครั้งก่อนการใช้ ตาม method 3.6.3 AABB Technical Manual

การนำ enzyme technique มาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี ทำโดยการย่อย screening cells ด้วยเอ็นไซม์แล้วล้างเอ็นไซม์ออกก่อนนำไปหยดกับซีรัม ช่วยในการตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Rh, Lewis, P ที่มีระดับอ่อนๆ ได้ดี แต่ต้องทำร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่น salineroom temperature และ saline IAT เนื่องจาก วิธีเอ็นไซม์ไม่สามารถตรวจพบ anti-M, anti-N, anti-Fy^a หรือ anti Fy^b ได้ เนื่องจากแอนติเจนเหล่านี้ถูกทำลายระหว่างการย่อย นอกจากนี้วิธีเอ็นไซม์มักตรวจพบ cold antibody ที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิก เช่น anti-IIssitt ให้คำแนะนำว่าควรนำวิธีเอ็นไซม์มาใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) จะเหมาะสมกว่าการนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี (antibody screening)

Positively charged molecules[21]

Polymers ที่มีประจุบวก เช่น hexadimethrine bromide (Polybrene), protamine sulfate และ poly-L-lysine เมื่อผสมกับเม็ดเลือดแดงและซีรัมจะทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกันขึ้น เนื่องจากประจุลบของ sialic acid บนผิวของเม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับประจุบวกของสาร polymer เมื่อใส่ neutral salt เช่น sodium citrate เม็ดเลือดแดงจะกระจายออกจากกัน แต่เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่จะจับกลุ่มกันต่อไป

วิธีการของ Polybrene

Incubate เม็ดเลือดแดงกับซีรัมใน medium ที่เป็น low ionic strength solution เพื่อช่วยให้แอนติบอดีเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนได้เร็ว นาน 1 นาที ใส่ working Polybrene เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่น เท supernatant ทิ้ง ใส่ resuspending solution ซึ่งมี trisodium citrate เป็นส่วนประกอบสำคัญลงไป เขย่าเบาๆ ดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ถ้าต้องการทำ antiglobulin test ต่อ ให้ล้างเซลล์ด้วย 0.01 M sodium citrate solution 3 ครั้งแล้วหยด AHG reagent

การแปลผล ถ้ามีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหลังจากเติม resuspending solution ถือว่าให้ผลบวก

Control ควรทำ control อ่านควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง โดยใช้ซีรัมที่ไม่มี unexpected antibody แทน unknown serum ของผู้ป่วยหรือ donor

Polybrene เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อยเนื่องจาก incubate ที่อุณหภูมิห้องเพียง 1 นาที เป็นเทคนิคที่ใช้มากในประเทศไต้หวัน แต่มีข้อเสียคือตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Kell ได้ไม่ดี

Grading reactions[17]

การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหรือการแตกของเม็ดเลือดแดง เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี การอ่านผลควรทำทันทีที่ปั่นเสร็จ ไม่ควรทิ้งไว้นาน เนื่องจากอาจเกิด false negative ได้ และก่อนเขย่าหลอดเลือดควรดูสีของซีรัมว่ามี hemolysis เกิดขึ้นหรือไม่ แล้วจึงเขย่าหลอดเลือดเบาๆ จนกระทั่งเม็ดเลือดแดงที่เกาะอยู่ที่ก้นหลอดหลุดออกหมด การให้ gradeควรทำระหว่างการเขย่าหลอดเลือด ถ้าไม่มีการจับกลุ่มให้ผลเป็นลบ ปฏิกิริยา 1+, 2+, 3+, 4+ แสดงถึงจำนวนของแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง

Autologous control[17]

ห้องปฏิบัติการบางแห่งทำ autologous control ร่วมไปกับการตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วย โดยใช้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วยเอง ผลบวกของปฏิกิริยาอาจเกิดจาก autoimmune hemolytic anemia, drug-induced hemolytic anemia, hemolytic transfusion reaction อย่างไรก็ตามการที่ autologous control ให้ผลบวก อาจเกิดจากสาเหตุอื่นๆ ได้ เช่น โปรตีนในซีรัมสูง ผู้ป่วยมี urea nitrogen ในเลือดสูง จากผลของการศึกษาเป็นจำนวนมากพบว่าการทำ autologous control ในผู้ป่วยไม่ค่อยมีประโยชน์เท่าที่ควร ดังนั้นห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ จึงไม่ทำ autologous control ร่วมไปกับการตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วย

การแปลผล[17]

การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหรือการแตกของเม็ดเลือดแดง ไม่ว่าระยะใดในการทดสอบ ถือว่าให้ผลบวก การแปลผลพิจารณาดังนี้

1. Phase ของการเกิดปฏิกิริยา แอนติบอดีชนิด IgM จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องพบการจับกลุ่มได้ใน saline medium แอนติบอดีเหล่านี้ได้แก่ anti-M, anti-N, anti-Le^a ,anti-Le^b, anti-P_1, anti-Mi^a แอนติบอดีชนิด IgG จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ดีที่ 37 ˚C ตรวจพบได้ที่ AHG phase ได้แก่แอนติบอดีในระบบ Rh, Kidd, Duffy เป็นต้น

2. Autologous control ให้ผลบวกหรือลบ ในกรณีที่ทำ autologous control ถ้าผล antibody screening ให้ผลบวก แต่ autologous control ให้ผลลบ แสดงว่า แอนติบอดีที่ตรวจพบเป็นชนิด alloantibody ถ้า antibody screening ให้ผลบวกและ autologous control ให้ผลบวกด้วยอาจเกิดจากผู้ป่วยมี autoantibody หรือมีแอนติบอดีต่อยาที่ได้รับ ถ้าผู้ป่วย

เพิ่งได้รับเลือด ผลบวกอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยสร้าง alloantibody ต่อเม็ดเลือดแดงของ donor และ alloantibody นั้นทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของ donor ที่ได้รับเข้าไปควรถามประวัติการรับเลือดของผู้ป่วยเพื่อช่วยในการแปลผล

3. ถ้าซีรัมให้ผลบวกกับ screening cells ทั้ง 2 หลอดให้พิจารณาจาก grade และ phase ของปฏิกิริยา ถ้ามี แอนติบอดี 1 ชนิดจะให้ปฏิกิริยากับ screening cells ที่ phase เดียวกันและ grade เท่ากัน ยกเว้นระบบที่มี dosage effect ได้แก่ ระบบ MNSs, Rh, Kidd และ Duffy แอนติบอดีมากกว่า 1 ชนิด phase ของปฏิกิริยาอาจต่างกันแล้วแต่ชนิดของแอนติบอดี และ grade ของปฏิกิริยาอาจต่างกันด้วย

4. ปฏิกิริยา hemolysis หรือ mixed-field agglutination แอนติบอดีที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงใน saline medium ได้แก่ anti-H, anti-P+P_1+P^k และ anti-Vel แอนติบอดีที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงโดยวิธี two-stage enzyme technique ได้แก่ anti-Le^a, anti-Le^b, anti-P_1, anti-Jk^a และ anti-Jk^b แอนติบอดีที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแบบ mixed -field ได้แก่ anti-Sd^a และแอนติบอดีในระบบ Lutheran

5. เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มจริงหรือเกิดจาก rouleaux formation ซีรัมของผู้ป่วยที่มี albumin และ globulin ratio ผิดปกติเช่นในผู้ป่วย multiple myeloma หรือผู้ป่วยที่ได้รับ high molecular weight plasma expander เช่น dextran อาจทำให้เกิด rouleaux formation ซึ่งเป็น non-specific aggregation ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เราสามารถแยก rouleaux formation ออกจากปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่แท้จริงได้โดยวิธี saline replacement

เทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นเป็นเทคนิคที่ทำในหลอดทดลอง ได้ทำกันมานานและยังทำอยู่ในปัจจุบัน แต่ในระยะหลังๆ ได้มีการนำเทคโนโลยีใหม่ๆ มาใช้ในงานประจำวัน ทั้งการตรวจหาแอนติบอดี การตรวจความเข้ากันได้ของเลือด และอื่นๆ เทคนิคใหม่ที่ได้รับการพัฒนาและผ่านการรับรองโดย Food and Drug Administration แล้ว[22] ได้แก่ gel technique solid-phase technique และ affinity-column technology ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ gel technique และ solid-phase technique

Gel technique[22]

ในปี ค.ศ. 1985 Dr. Yves Lapierre of Lyon ชาวฝรั่งเศส ได้พัฒนา gel technique ขึ้นมาใช้เพื่อให้ end point ของปฏิกิริยานั้น stable ทำให้การอ่านผลง่ายและเที่ยงตรง เมื่อเปรียบเทียบกับการอ่านผลโดยการเขย่าหลอดทดลอง

Gel card เป็น plastic card มี 6 microtubes แต่ละ microtube ประกอบด้วย chamber และ column chamber หรือ กระเปาะเป็นที่สำหรับให้เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับซีรัม ส่วน column ภายในมี dextran-acrylamide gel และ reagent แล้วแต่ชนิดของ gel card บรรจุอยู่ gel particle ทำหน้าที่เป็นตัวกลางและตัวกรองเม็ดเลือดแดงที่มีการจับกลุ่มระหว่างการปั่น เม็ดเลือดแดงที่ไม่มีการจับกลุ่มจะผ่านลงสู่ก้น microtube เม็ดเลือดแดงที่มีการจับกลุ่มจะค้างอยู่บน gel หรือกระจายอยู่ใน column แล้วแต่ขนาดของการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง การอ่านผล ไม่ต้องเขย่าทำให้อ่านผลและแปลผลง่ายกว่าการใช้หลอดทดลอง และสามารถอ่านระดับความแรงของปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน

4+ เห็นเป็นแถบสีแดงอยู่บน gel column ทั้งหมด

3+ เม็ดเลือดแดงส่วนมากอยู่บน gel column มีเม็ดเลือดแดงบางส่วนกระจายออกมาบ้างบริเวณครึ่งบนของ column

2+ เม็ดเลือดแดงกระจายทั่ว column

1+ เม็ดเลือดแดงกระจายที่ส่วนล่างของ column บางส่วนตกอยู่ที่ก้น microtube

Negative เม็ดเลือดแดงตกอยู่ก้น microtube ทั้งหมด

Mixed-field เห็นเป็นแถบของเม็ดเลือดแดงตรงส่วน

บนสุดของ gel และมีเม็ดเลือดแดงที่ไม่ทำปฏิกิริยาตกที่ก้น microtube ก่อนแปลผลว่าเป็น mixed-field ควรตรวจสอบประวัติการรับเลือดของผู้ป่วย รวมทั้งเม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการตรวจเสียก่อน

Negative reaction อาจเกิดคล้ายเป็น mixed-field ได้ถ้าซีรัมยัง clot ไม่ดีมีไฟบริน ไฟบรินจับเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดเป็นเส้นสีแดงบางๆ ที่ส่วนบนสุดของ gel ดูคล้าย mixed-field

การตรวจหาแอนติบอดีโดย gel technique โดยทั่วไปใช้ gel card ชนิด LISS Coombs card ซึ่งภายใน column มี AHG reagent บรรจุอยู่ เมื่อต้องการตรวจหาแอนติบอดี หลังจาก label หมายเลขของตัวอย่างเลือดแล้วเปิด aluminium foil ที่ปิดออกใช้ automatic pipette ดูด screening cells ซึ่ง suspend ใน LISS ใส่ใน chamber 50 μL จากนั้นดูดซีรัม หรือพลาสมาที่ต้องการตรวจใส่ใน chamber 25 μL incubate ที่ 37°C นาน 15 นาที ใน incubator สำหรับ gel card แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นสำหรับ gel card 490 rpm นาน 10 นาที อ่านผล

แอนติบอดีบางชนิดที่เป็น IgM เช่น anti-Le^a, anti-Le^b, anti-M, anti-N และ anti-P_1 อาจตรวจไม่พบโดยวิธีนี้ ถ้าต้องการตรวจหาแอนติบอดีเหล่านี้ ควรเลือกใช้ gel card ชนิด neutral card ซึ่งภายใน column จะบรรจุ gel และ buffered salt solution ไม่มี AHG reagent บรรจุอยู่ หลังจากใส่ screening cells และซีรัมแล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ปั่นอ่านผล ก็จะสามารถตรวจพบแอนติบอดีเหล่านี้ได้ นอกจากนั้น neutral card ยังใช้สำหรับวิธี one-stage และ two-stage enzyme ได้ด้วย

Solid-phase technology[22]

ในปี ค.ศ. 1978 Rosenfield และคณะ ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจแอนติเจนของเม็ดเลือดแดง และตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม จากนั้นในปี ค.ศ. 1984 Plapp และคณะ ได้รายงานการตรวจแอนติเจน และแอนติบอดีโดยวิธี solid-phase red cell adherence (SPRCA)

Solid-phase technique ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเกิดในหลุมของ microplate ระยะแรกของการพัฒนาวิธีการนี้ ใช้การเคลือบ microwell ด้วยเม็ดเลือดแดง จากนั้นใส่ซีรัมหรือพลาสมา incubate ที่ 37°C หลังการ incubate ล้างเอาแอนติบอดีที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงออกแล้วใส่เม็ดเลือดแดงที่ coat ด้วย anti-IgG เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงที่เคลือบ microwell กับแอนติบอดีในซีรัมหรือพลาสมาหรือไม่ ปั่นอ่านผลด้วยเครื่องปั่น microplate

ผลบวกของปฏิกิริยา จะเห็นเม็ดเลือดแดงแผ่กระจายที่ก้นหลุม

ผลลบของปฏิกิริยา จะเห็นเม็ดเลือดแดงตกเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม

การอ่านผล มักอ่านผลเป็น strong positive, positive และ negative ไม่สามารถอ่านผล mixed-field ได้

ระยะที่ 2 ของการพัฒนาเทคนิคนี้ สำหรับการตรวจแอนติบอดี ได้ใช้ผนังของเม็ดเลือดแดงเคลือบ microwell ระหว่างขั้นตอนการผลิตผนังของเม็ดเลือดแดง จะแห้งติดกับ microwell

ปัจจุบันได้มีการพัฒนานำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีโดยบริษัทต่างๆ ลักษณะเป็น microplate 96 หลุม ก้นหลุมเป็น U-shape หรือ เป็น strip 1x8 หรือ 2x8 (1 แถวหรือ 2 แถว ของ U-bottomed wells)

ข้อดีและข้อเสียของ gel technique และ solid-phase technique

ข้อดี

1. Standardization ในขณะที่ tube test อาศัยการเขย่าในการอ่านผลซึ่งไม่สามารถวัดมาตรฐานความแรงของการเขย่าในแต่ละคนได้ ผลของวิธี tube test จึงขึ้นกับความชำนาญในการอ่านผล ในขณะที่วิธี gel และ

solid-phase อ่านผล end-point ของปฏิกิริยาโดยไม่ต้องมีการเขย่าทำให้อ่านผลได้ง่ายกว่า และผิดพลาดน้อยกว่า

2. Stable ผลของปฏิกิริยาเก็บไว้อ่านได้ 2-3 วัน
3. Simple เป็นวิธีที่ง่ายสะดวก ไม่ต้องมีการล้าง Coombs
4. ใช้ซีรัมหรือพลาสม่าจำนวนน้อย

ข้อเสีย

ต้องใช้ incubator และ centrifuge เฉพาะของ gel card หรือของ microplate รวมทั้งราคาแพงกว่า tube test

สรุป

แม้จะมีเทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิตระบบต่างๆ อยู่หลายวิธี แต่วิธีที่ใช้กันมากในปัจจุบันก็คือวิธี Saline IAT เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ดี ไม่มีความยุ่งยากในการทำ ถ้าทำอย่างถูกต้องจะสามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก และลดภาระการตรวจพบและตรวจหาชนิดของแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกได้

เอกสารอ้างอิง

1. *Giblett ER. Blood group alloantibodies: An assessment of some laboratory practices. Transfusion 1977;17:299.*
2. *Boral L, Henry IB. The type and screen: A safe alternative and supplement in selected surgical procedures. Transfusion 1977;17:163.*
3. *Harmening DM, ed. Detection and identification of antibodies. In: Modern blood banking and transfusion practices, 4th ed. Thailand: Book Promotion & Service 1999:254-5.*
4. *Cutbush M, Mollison PL. Brit J Haematol 1958;4:115.*
5. *Mollison PL. Brit J Haematol 1959;2:1035.*
6. *Mollison PL. Brit J Haematol 1959;2:1123.*
7. *Mollison PL. Brit Med Bull 1959;15:92.*
8. *Mollison PL. Acta Haematol 1959;10:495.*
9. *Mollison PL, Johnson CA, Prior DM. Dose- dependent destruction of A1 cells by anti- A_1. Vox Sang 1978; 35:149.*
10. *Morel PA, Garatty G, Perkins HA. Clinically significant and insignificant antibodies in blood transfusion. Amer J Med Technol 1978;44:122.*
11. *Cronin CA, Pohl BA, Miller WV. Crossmatch compatible blood for patients with anti- P_1. Transfusion 1978;18:728.*
12. *Issitt PD. Clinically significant and insignificant antibodies. Washington D.C.: AABB 1979:13.*
13. *Garatty G. Clinically significant and insignificant antibodies. Washington D.C.: AABB 1979:29.*
14. *Waheed A, Kennedy MS, Gerhan S, Senhauser DA. Transfusion significance of Lewis system antibodies. Success in transfusion with crossmatch -compatible blood. Am J Clin Pathol 1981;76:194.*
15. *Issitt PD. Advances in pathology, anatomic and clinical. Pergamon, Oxford, part 1. 1982:395.*
16. *Issitt PD. Antibody detection and identification and compatibility testing. In: Applied blood group serology. 3rd ed. Miami, Florida: Montgomery Scientific Publications. 1985:478.*
17. *Harmening DM, ed. Detection and identification of antibodies. In: Modern blood banking and transfusion practices. 4th ed. Thailand: Book Promotion & Service 1999:256-8.*
18. *Walker RH, ed. Technical Manual. 10th ed. Arlington, VA: AABB 1990:277.*
19. *Brecher ME, ed. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, MD: AABB 2003:383.*
20. *Brecher ME, ed. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, MD: AABB 2003:260.*
21. *Brecher ME, ed. Technical Manual. 14th ed. Bethesda, MD: AABB 2003:258, 694-6.*
22. *Harmening DM, ed. Alternative techniques in routine blood bank testing. In: Modern blood banking and transfusion practices. 4th ed. Thailand: Book Promotion & Service 1999:546-52.*

CME Credit

จงเลือกข้อที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อเดียวลงในแบบส่งคำตอบ CME Credit ท้ายเล่ม

1. Based on the following phenotypes, which pairs of cells would make the best screening cells ?
   A. Cell 1: Group O, D+C+c-E-e+, Mi(a+), Fy(a-b+), Jk(a-b+), M-N+S-s+
      Cell 2: Group O, D+C-c+E+e-, Mi(a-), Fy(a+b-), Jk(a+b-), M+N-S+s-
   B. Cell 1: Group O, D+C+c-E-e+, Mi(a+), Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N-S+s-
      Cell 2: Group O, D+C-c+E+e-, Mi(a-), Fy(a-b+), Jk(a-b+), M-N+S-s+
   C. Cell 1: Group O, D-C-c+E-e+, Mi(a+) Fy(a+b-), Jk(a+b+), M+N-S+s-
      Cell 2: Group O, D+C+c-E+e+, Mi(a-), Fy(a+b+), Jk(a+b+), M-N+S-s+
   D. Cell 1: Group O, D+C+c+E+e+, Mi(a-), Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S-s+
      Cell 2: Group O, D+C+c+E+e+, Mi(a+), Fy(a+b+), Jk(a+b+), M+N+S+s+
   E. Cell 1: Group O, D+C-c+E-e+, Mi(a+), Fy(a+b+), Jk(a+b-), M+N-S-s+
      Cell 2: Group O, D+C+c+E+e+, Mi(a-), Fy(a-b+), Jk(a+b+), M+N+S+s+

2. Clinically significant antibody is defined by:
   A. The ability of an antibody to bind to red cells at 37°C.
   B. The ability of an antibody to cause hemolytic transfusion reaction.
   C. The ability of an antibody to bind to red cells at room temperature.
   D. A and B are corect
   E. A, B and C are correct

3. Which antibody does not show dosage effect?
   A. Anti-M
   B. Anti-Mi^a
   C. Anti-E
   D. Anti-Jk^a
   E. Anti-Fy^a

4. Which of the following red cell phenotypes is homozygous ?
   A. Jk(a-b+)
   B. Jk(a+b+)
   C. Fy(a+b-)
   D. D+
   E. A and C are correct

5. Which of the following antibodies is most likely to be detected at low temperature ?
   A. Anti-Fy^b
   B. Anti-Jk^a
   C. Anti-M
   D. Anti-S
   E. Anti-s.