The Gel Test เทคนิคการตรวจแบบใหม่ทาง red cell serology

รัชนี โอเจริญ พ.บ.

นับตั้งแต่ Karl Landsteiner ได้ค้นพบหมู่เลือดระบบ ABO ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1900 โดยวิธีการตรวจง่าย ๆ คือเอา serum ของคน ๆ หนึ่งผสมกับเม็ดเลือดแดงของคนอื่น จะพบมีการเกาะกลุ่ม (agglutination) ของเม็ดเลือดแดง และจากการทดลองเอา clotted blood ของบุคลากรในที่ทำงานของเขาจำนวนหนึ่ง มาผสมไขว้กันไปมาระหว่าง serum ของคน ๆ หนึ่งกับเม็ดเลือดแดงของอีกคนหนึ่ง ทำให้เขาและคณะพบหมู่เลือดระบบ ABO ว่าอาจจะแบ่งหมู่เลือด ABO ของคนเราออกไปได้เป็น 4 หมู่คือ A, B, O, และ AB[1] ตั้งแต่การค้นพบครั้งนั้นจนกระทั่งปัจจุบันเป็นเวลามากกว่า 90 ปี การตรวจหาหมู่เลือดระบบ ABO ก็ยังคงเป็นวิธีการดู agglutination เช่นเดิม

การเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง (agglutination) เป็นผลจากปฏิกิริยาของ antigen และ antibody ของเม็ดเลือดแดง antigen ของเม็ดเลือดแดงจะอยู่ที่ surface membrane ของเม็ดเลือดแดง ส่วน antibody จะอยู่ในส่วน plasma หรือ serum เมื่อใดก็ตามที่ serum และเม็ดเลือดแดงผสมกัน โดยมี antigen และ antibody ตัวเดียวกัน ก็จะเกิดปฏิกิริยา agglutination เช่นใน serum มี anti-A ส่วนเม็ดเลือดแดงมี A antigen เมื่อนำ serum นั้นมาผสมกับเม็ดเลือดแดงบนสไลด์หรือหลอดทดลอง เราจะเห็นปฏิกิริยา agglutination ทันที ทั้งนี้เพราะ antibody นั้น จะเกาะติดและทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างเซลเม็ดเลือดแดงหลาย ๆ เซลเข้าด้วยกัน

ความรู้ทางด้าน red cell antigen และ antibody ได้เพิ่มพูนขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งการค้นพบที่สำคัญอีกจุดหนึ่ง คือในปี ค.ศ. 1945 Coombs, Mourant และ Race ได้ค้นพบว่าวิธีการตรวจให้เห็นปฏิกิริยาของ coating Rh antibodies ซึ่งต่อมาวิธีการเดียวกันนี้สามารถใช้ตรวจ in vivo coating antibody และ coating antibody ที่มี complement ร่วมด้วย[2-4] วิธีการตรวจ ซึ่งเรียกว่า Coombs'test ตามชื่อผู้ค้นพบคนแรกนี้ก็ยังคงเป็นวิธีการตรวจที่จำเป็นต้องใช้กันอยู่จนถึงปัจจุบัน

การตรวจทางด้าน red cell serology หรือ immunohematology หรือในธนาคารเลือดทั่ว ๆ ไป ประกอบด้วยการตรวจพื้นฐานเหล่านี้คือ

1. ABO grouping
2. Rh typing, other blood group system typing
3. Screening and identification of atypical antibody
4. Cross matching
5. Direct and indirect antiglobulin test (direct and indirect Coombs' test)

สำหรับศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ฯ หรือธนาคารเลือดใดก็ตามที่มีการรับบริจาคเลือด และจะต้องตรวจสอบเลือดของผู้บริจาคก่อนนำไปใช้ (blood processing)

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

กับผู้ป่วยนั้น จะต้องมีการตรวจสอบยูนิตเลือดดังนี้

1. ABO grouping
2. Rh typing (เฉพาะหน่วยงานที่มีความพร้อม)
3. Screening atypical antibody
4. VDRL
5. HBsAg
6. anti-HIV
7. HIV Ag (เฉพาะหน่วยงานที่มีความจำเป็นและมีความพร้อม)
8. anti-HCV (เฉพาะหน่วยงานที่มีความจำเป็นและมีความพร้อม)

จะเห็นได้ว่าปริมาณงานและการตรวจที่จำเป็นต่าง ๆ เหล่านี้มีมากมาย จึงได้มีผู้พยายามคิดค้นวิธีการตรวจที่ดีขึ้น ไวขึ้น และมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่นการเติม reagent บางตัว เข้าไปเพิ่มเติมในหลอดทดลอง

Low Ionic Strength Saline (LISS)

น้ำยา LISS นี้จะช่วยลด ionic strength ใน reaction medium จาก 0.15 molar ลงเหลือ 0.09 molar ซึ่งจะช่วยให้ antibody เกิดปฏิกิริยาจับกับ antigen ได้เร็วขึ้น และสามารถลดระยะเวลา incubate จาก 1 ชม.ลงเหลือ 15-20 นาที ก่อนที่จะล้างและเติมน้ำยา Coombs reagent เรียกว่า LISS indirect antigloblulin test (LISS-IAT)

Polyethylene glycol (PEG)

เป็นสารซึ่งส่วนมากใช้ในการ concentrate และ precipitate protein PEG ที่มี molecular weight 4,000 สามารถช่วยส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาการจับกันของ Ag-Ab reaction ได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามผลของการใช้ไม่ได้ดีกว่า LISS IAT มากนัก

Polybrene เป็นสารซึ่ง Lalezari ในปี 1968 ได้นำมาใช้เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาในการตรวจ red cell antibody โดยใช้เครื่อง automate และต่อมาในปี 1980 ก็สามารถนำมาใช้โดยวิธี manual ได้ด้วย วิธีนี้ช่วยลดระยะเวลา incubation period ลงไปอีก จนเหลือเพียง 1-2 นาที[5]

Enzyme technique

ช่วยการตรวจสอบพวก weak Rh antibodies และนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจ screening atypical antibodies แต่ไม่ใช้ในกรณีการทำ crossmatching เพราะเทคนิคนี้มักให้ผล false positive ได้บ่อย[6]

เทคนิคต่าง ๆ ที่เพิ่มขึ้นมาเพื่อช่วยการตรวจให้ไวขึ้นและเร็วขึ้นดังกล่าวไม่ว่าจะเป็นการใช้ LISS, PEG, Polybrene, หรือ enzyme ต่าง ๆ ส่วนใหญ่ก็ยังคงใช้เทคนิคแบบ test tube เดิม ๆ นั่นเอง ต่อมาจึงเริ่มพยายามนำ microtitre plates ไม่ว่าจะเป็น U or V bottom มาใช้ทาง red cell serology บ้าง เรียกว่าวิธี microplates แต่ละ plate จะมี 96 หลุม ส่วนใหญ่จะใช้ในการตรวจ ABO grouping, Rh typing และ antibody screening by enzyme technique[7]

เทคนิคการตรวจที่เรียกว่า solid-phase นั้นใช้ red cells หรือ red stroma ในฟอร์มของ solid phase ที่เกาะติดกับเนื้อ plastic ของ well ของ plate ที่จะใช้ เวลาที่จะตรวจจึงค่อยเติม serum และน้ำยา LISS ลงไป

เทคนิคใหม่ซึ่งน่าจะถือได้ว่าเป็น breakthrough ของการตรวจทาง red cell serology คือ microtube เทคนิค ซึ่งใน microtube นี้จะใส่สาร sephadex-gel (the Diamed Gel System) หรือ glass micro-beads (the Ortho Biovue system) ทั้ง 2 บริษัทใช้หลักการอันเดียวกัน คือเซลที่ agglutinate จะถูกจับอยู่ส่วนบนของ microtube ส่วนเซลที่ไม่ agglutinate จะตกลงไปที่ก้นหลอด microtube[8]

The Gel Test System ซึ่งพัฒนาโดยบริษัท Diamed ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ได้ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือด และศูนย์บริการโลหิตต่าง ๆ ทั่วยุโรปและออสเตรเลียมากกว่า 50 ประเทศ ทั้งหมดกว่า 300 ล้าน tests แล้ว ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยในแง่มุมต่าง ๆ พบว่าเป็นเทคนิคที่ sensitive, reliable, practical, cost effective และ safe มาก

สำหรับการตรวจ samples ที่อาจติดเชื้อ[8] จึงน่าที่เราจะต้องศึกษาและติดตามเทคนิคใหม่นี้อย่างใกล้ชิด

The Gel Test System นี้ได้คิดค้นขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 โดย Mr.Y Lapierre ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสที่ทำงานรับผิดชอบของการตรวจในธนาคารเลือด เขาและคณะได้พัฒนารูปแบบของ microtube จนในที่สุดได้ทำเป็นแผ่นพลาสติก (plastic card) ซึ่งแต่ละ card ขนาดกว้าง 5 cm ยาว 7 cm มี microtube อยู่ 6 tube ความหนาประมาณครึ่งเซนติเมตร และใช้ gel เป็น sephadex G 100 supertine ซึ่งอาจจะมี antisera หรือ reagent อื่น ๆ ผสมอยู่หรือไม่ก็ได้ จึงอาจแบ่งชนิดของ gel ออกเป็น 3 ชนิด คือ neutral gels ซึ่งมีแต่ gel ล้วน ๆ ไม่มี reagent อื่น ๆ ผสมอยู่ specific gel ซึ่งเติม red cell antibody ผสมอยู่ใน gel และ antiglobulin gel ซึ่งมี antiglobulin serum ผสมอยู่

หลังจากการใช้ 3 ปีในการพัฒนา ตั้งแต่ ค.ศ. 1989 บริษัท Diamed A.G., Switzerland จึงได้นำ Gel Test วางตลาด และจะมี card ชนิดต่าง ๆ ให้เลือกใช้ สามารถนำมาใช้ได้ครอบคลุมทุก test ที่มีความจำเป็นต้องใช้ในทางธนาคารเลือด เช่น ABO grouping, Rh typing, other blood group system, typing antibody screening, antibody identification, crossmatching, direct antiglobulin test และหลังปี ค.ศ. 1992 ก็จะมีเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจนี้แบบ fully automate ได้ ในกรณีซึ่งมี sample จำนวนมาก ที่จะต้องตรวจ เช่น blood transfusion service centre เป็นต้น[8,9]

จากการศึกษาจากหลาย ๆ สถาบันพบว่าเทคนิค Gel Test นี้ มีข้อดีเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ[10] คือ

1. เป็น test ซึ่งใช้ serum หรือ cell น้อยมาก เพียงแค่ 25 หรือ 50 ul เท่านั้น จึงประหยัด antisera หรือ serum ผู้ป่วยและใช้ได้ดีในกรณีคนไข้ newborn ซึ่งเจาะเลือดเด็กได้จำนวนน้อย

2. Step antiglobulin test ไม่ต้องล้างด้วย normal saline ทำให้ลดขั้นตอนการตรวจ และไม่เป็นปัญหาในเรื่องการกำจัดน้ำล้าง ในกรณีซึ่ง sample อาจจะมีเชื้อโรคที่ติดต่อโดยการสัมผัสเลือดเช่น HIV

3. ปฏิกิริยาเห็นชัดเจนและไม่เปลี่ยนแปลงถึง 2-3 วัน ทำให้ไม่ต้องรีบอ่านปฏิกิริยา สามารถทบทวนผลการตรวจด้วยตนเอง หรือโดย supervisor และ xerox ปฏิกิริยาเก็บไว้ศึกษา หรือเป็นหลักฐานผลการตรวจได้ตลอดไป ถ้ามีข้อสงสัยในผลการตรวจต้องการปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ สามารถนำ card ติดตัวไปสอบถามด้วยตนเอง หรือแม้แต่ xerox ผลปฏิกิริยาแล้ว Fax ไปปรึกษา ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศได้

4. อ่านผลปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า ไม่ต้องอ่านปฏิกิริยาด้วยกล้อง ทำให้ผู้ปฏิบัติงานไม่ปวดสายตา เวลาต้องอ่านกล้องมาก ๆ

5. ไม่ต้องมีการเขย่าหลอดทดลอง ตัดปัญหาเขย่าเบาเกินไปหรือแรงเกินไป

6. ประหยัดเวลา, ค่าใช้จ่าย และบุคลากร

7. ห้องปฏิบัติการสะอาด และลดโอกาสการแพร่กระจายเชื้อต่าง ๆ

การตรวจโดยเทคนิค Gel Test นี้มีข้อดีมากก็จริง แต่จุดอ่อนก็ยังมีอยู่คล้าย ๆ การตรวจโดยเทคนิคอื่น โดยเฉพาะผู้ทำการตรวจจะต้องได้รับการฝึกปฏิบัติมาอย่างดี ปฏิบัติการตามขั้นตอนการตรวจได้ถูกต้อง และมีความรู้พื้นฐานทาง immunohematology ดีพอสมควรที่จะเข้าใจและ interprete ผลการตรวจ หรือการตัดสินใจว่าจะตรวจสอบอะไรเพิ่มเติมบ้าง ธนาคารเลือดใดที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ จึงต้องศึกษาเปรียบเทียบดูว่าเหมาะสมกับธนาคารเลือดของตนเองหรือไม่มากน้อยเพียงใด

เอกสารอ้างอิง

1. Walker R.H. ABO, H and P blood groups ans structurally related antigens. AABB Technical Manual 10th edition 1990 ; 173-4.
2. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br. J Ep Pathol 1945 ; 26 : 255-66.

3. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. In-vivo iso-sensitisation of red cells in babies with haemolytic disease. Lancet 1946 ; 1 : 264-6.
4. Dacie JV, Crookston JH, Christenson WN. Incomplete cold antibodies: role of complement in sensitization to antiglobulin to serum by potentially hemolytic antibodies. Br. J Haematol 1957 ; 3 : 77-87.
5. Malde R,et al. The manual low-ionic strength polybrene technique for detection of red cell antibodies. Med. Lab. Sciences 1986 ; 43 : 360-3.
6. Scott ML,et al. Optimum enzyme activity in blood grouping. Med Lab. Sciences 1988 ; 45 : 7-18.
7. Roberts B.Microplate technique in liquid phase blood grouping and antibody screening. Standard Haematology Practice. 199 ; 194 : 88 Blackwell Scientific.
8. Lapierre Y, et al. The Gel Test : a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990 ; 30 : 109-13.
9. Lapierre Y. The gel test at the end of 1992. the 22th ISBT Congress Education Programme Summary of Conferences. Brajet 1982 : 69-70.
10. The gel test, a new horizon in blood group serology. Symposium New Techniques in Blood Grouping Serology at The World Congress of Medical Technology. Switzerland 9-10 August 1990.