นิพนธ์ต้นฉบับ

Comparison of Low Ionic Strength Solution, Polyethylene Glycol and Manual Polybrene for Antibody Detection[1]

อุดม ติ่งต้อย ศศิธร เพชรจันทร* ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช และ จริยา สายพิณ*

*ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย *ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล*

บทคัดย่อ : *ความไวของวิธีการตรวจกรองหาแอนติบอดีมีความสำคัญมากเพื่อเป็นการเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยในกรณีที่เป็น weak antibody การใช้ enhancing reagent อาจช่วยให้เห็นปฏิกิริยาได้เด่นชัดขึ้น* ***วัตถุประสงค์ :*** *เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการใช้ Low ionic strength solution (LISS) Polyethylene glycol (PEG) และ Manual polybrene (MP) ในการช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาของแอนติเจนและแอนติบอดี ในขั้นตอน Indirect antiglobulin test (IAT)* ***วัสดุและวิธีการ :*** *ตรวจกรองหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตทั่วไปจำนวน 200 ราย วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Friedman test และหาความแรงของแอนติบอดี จากซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดี 122 ราย โดยทำการตรวจกรองหาแอนติบอดีด้วย 3 วิธีดังกล่าวก่อน ถ้าให้ผลบวกในขั้นตอน IAT เหมือนกันทั้ง 3 วิธีจึงนำมาหาความแรงของแอนติบอดี ผลที่ได้เปรียบเทียบความไว โดยใช้ Wilcoxon Signed Ranks test* ***ผลการศึกษา :*** *การตรวจกรองหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต 200 ราย พบว่าการใช้วิธี LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT ตรวจพบแอนติบอดี 5 ราย (ร้อยละ 2.5) 5 ราย (ร้อยละ 2.5) และ 4 ราย (ร้อยละ 2) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนการเปรียบเทียบหาความแรงของแอนติบอดีที่ทราบชนิดแล้วจำนวน 101 ราย พบว่า การตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Lewis เมื่อใช้ LISS-IAT ได้คะแนน mean score (15.6) สูงที่สุด รองลงไปคือ MP-IAT (11.2) และ PEG-IAT (10.1) ตามลำดับ ส่วน PEG-IAT ให้ความไวในการตรวจ anti-D anti-E anti-Jk^{a} anti-Jk^{b} anti-M และ anti-N ดีกว่าใน MP-IAT และ LISS-IAT ตามลำดับ และ PEG-IAT ยังให้ความไวในการตรวจ anti-Fy^{a} anti-Fy^{b} anti-S anti-Mi^{a} และ anti-H ดีกว่า LISS-IAT และ MP-IAT ตามลำดับด้วย* ***สรุป :*** *การใช้ PEG-IAT มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการตรวจกรองหาแอนติบอดีทุกระบบ ยกเว้น แอนติบอดีในระบบ Lewis ซึ่งการใช้ LISS-IAT มีประสิทธิภาพดีกว่า*

Key Words : ● *Antibody screening LISS PEG MP*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2551;18:21-30.

---

[1]*เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ เพื่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต จาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ของนายอุดม ติ่งต้อย SITS/M 4437490*

ได้รับต้นฉบับ 15 ธันวาคม 2550 ให้ลงตีพิมพ์ 10 มกราคม 2551

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รศ.พญ. ศศิธร เพชรจันทร ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

ในปัจจุบันการตรวจเพื่อเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย (Pre-transfusion testing) ประกอบด้วย ABO grouping Rh (D) typing crossmatching และ antibody screening ซึ่งหากพบว่า antibody screening ให้ผลบวกจะต้องทำ antibody identification เพื่อหาชนิดของแอนติบอดีต่อไป ซึ่งในการจัดหาเลือดให้กับผู้ป่วยทุกครั้งจะต้องไม่มีแอนติเจนชนิดเดียวกับแอนติบอดีที่ตรวจพบ ไม่ว่าในครั้งนั้นจะตรวจพบแอนติบอดีตัวเดิมอีกหรือไม่ก็ตาม[1,2]

การตรวจกรองหาแอนติบอดี (antibody screening) ในซีรัมโดยทำการทดสอบระหว่างซีรัมกับเม็ดเลือดแดงหมู่โอ (screening cells) ซึ่งมีแอนติเจนต่างๆ ได้แก่ D C E c e M N S s P_1 Le^a Le^b Mi^a Jk^a Jk^b Fy^a Fy^b K k Di^a Di^b และ Xg^a มีความสำคัญมากเพราะเป็นการตรวจกรองหา unexpected antibodies ที่มีความสำคัญทางคลินิก (clinically significant antibodies) ให้ได้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ไม่ว่าแอนติบอดีนั้นจะมีความแรงเท่าใดก็ตาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ˚ซ. และ/หรือ Indirect antiglobulin test (IAT) เพราะหากไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี แต่นำเลือดซึ่งทำการ crossmatch ได้ผลลบไปให้ผู้ป่วยทั้งๆ ที่มีแอนติเจนชนิดเดียวกันกับแอนติบอดีที่มีอยู่แล้ว อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีอย่างรุนแรงได้ (delayed hemolytic transfusion reaction) ในกรณีที่เป็น weak antibody การใช้ enhancing reagent อาจช่วยให้เห็นปฏิกิริยาได้เด่นชัดขึ้น enhancing reagent เหล่านี้ได้แก่ Low ionic strength solution (LISS) Polyethylene glycol (PEG) Manual polybrene (MP) albumin และ enzyme[3-5] ดังนั้นการใช้วิธีที่มีความไว (sensitivity) ในการตรวจกรองแอนติบอดีจึงมีความสำคัญในการเตรียมเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย[6,7] วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจกรองแอนติบอดี ด้วยวิธี LISS PEG MP และศึกษาความไวของแต่ละวิธีด้วยการทดสอบความแรง

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่าง
   1.1 ตัวอย่างเลือดผู้บริจาคโลหิตได้จากการสุ่มตัวอย่าง จำนวน 200 ราย จากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
   1.2 ตัวอย่างซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดี 122 ราย ประกอบด้วยตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 69 ราย และเป็นตัวอย่างจากภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 53 ราย ได้แก่ anti-D 16 ราย anti-E 14 ราย anti-Mi^a 25 ราย anti-P_1 7 ราย anti-Fy^a 2 ราย anti-Fy^b 2 ราย anti-Jk^a 4 ราย anti-Jk^b 5 ราย anti-S 2 ราย anti-H 4 ราย anti-M 5 ราย anti-N 5 ราย anti-Le^a 16 ราย และ anti-Le^b 15 ราย โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านการยินยอมจากหัวหน้าธนาคารเลือดทุกราย

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 Screening cells Lot No 46100 Expiry date 13/11/03 จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

2.2 Panel cells Lot No 46100 Expiry date 13/11/03 จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

2.3 น้ำยา LISS จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

2.4 น้ำยา 20% PEG น้ำหนักโมเลกุล 3,350 (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, Mo., USA)

2.5 น้ำยา MP (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, Mo., USA)

2.6 น้ำยา monospecific antihuman globulin (AHG) และ polyspecific AHG จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วิธีการศึกษา

1. การตรวจกรองหาแอนติบอดีในเลือดผู้บริจาคโลหิตจำนวน 200 ราย ด้วยวิธี LISS PEG และ MP นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลของงานประจำในการตรวจกรองหาแอนติบอดี ที่ธนาคารเลือดศิริราช ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดศิริราชตรวจประกอบด้วย saline room temperature (Saline-RT) saline indirect antiglobulin test (Saline-IAT) และ two-stage papain (enzyme) โดยใช้ tube technique ถ้าผลการตรวจไม่ตรงกัน ทำการตรวจต่อว่าเป็นแอนติบอดีชนิดใด

2. การตรวจกรองหาแอนติบอดีในซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วจำนวน 122 ราย โดยใช้ LISS PEG และ MP ถ้าทั้ง 3 วิธีได้ผลบวก นำมาตรวจหาความแรง (titration)[8] ต่อไปโดยใช้วิธี LISS-IAT[9] PEG-IAT[9] และ MP-IAT[10]

3. วิเคราะห์ผลการศึกษา โดยใช้สถิติ Non-parametric: Friedman test สำหรับวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบ antibody screening และ Wilcoxon Sign Ranks test สำหรับวิเคราะห์ผลการเปรียบเทียบความแรง โดยใช้ โปรแกรม SPSS สำหรับ window

วิธีการทดลอง

วิธีเปรียบเทียบ antibody screening และ identification ของตัวกลางทั้ง LISS PEG และ MP มีวิธีการดังนี้

1. LISS-IAT[9] หยดซีรัม น้ำยา LISS และเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 3% ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 15 นาที ล้างเซลล์ 3 ครั้ง หยด polyspecific AHG ปั่นอ่านผล

2. PEG-IAT[9] หยดซีรัม น้ำยา 20%PEG และเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 3% ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 15 นาที ไม่ต้องปั่นอ่าน ล้างเซลล์ 4 ครั้ง หยด monospecific AHG ปั่นอ่านผล

3. MP-IAT10 หยดซีรัม เม็ดเลือดแดงเข้มข้น 3% และน้ำยา Low Ionic Medium (LIM) ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที หยด 0.05% polybrene ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ปั่นอ่านผล เทน้ำทิ้งให้หมด หยด resuspending solution ผสมให้เข้ากันดี อ่านผล agglutination ถ้าได้ผลลบ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ห้ามปั่นอ่านผลซ้ำ หยด resuspending solution ผสมให้เข้ากันดี ทำ IAT โดยล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วยน้ำยา 10 mM ของ sodium citrate ครั้งสุดท้ายเทน้ำทิ้งสลัดให้แห้งหรือซับให้แห้ง หยด monospecific AHG 2 หยด ปั่นอ่านผล

สำหรับ antibody screening จะต้องมี positive และ negative control โดย positive control ใช้ serum ที่มี anti-D และ negative control ใช้ serum ที่ไม่มีแอนติบอดี ส่วน antibody identification ต้องทำ autocontrol โดยใช้ serum ทดสอบกับเม็ดเลือดแดงของตัวเอง

วิธีหาความแรง ของตัวกลางทั้ง LISS PEG และ MP มีวิธีการดังนี้

1. เขียนที่หลอดทดลอง 1:2 ถึง 1:1024 จำนวน 10 หลอด สำหรับเจือจาง

2. เจือจาง serum ที่ทราบชนิดแอนติบอดี แต่ละรายด้วยน้ำเกลือ 0.9% เป็น 2 fold dilution

3. เขียนที่หลอดทดลองสำหรับปั่นอ่านผล 1:2 ถึง 1:1024 จำนวน 10 หลอด

4. ดูดซีรัมที่เจือจางแล้วจากหลอดทดลองที่ตำแหน่งสุดท้าย (1:1024) ไปหาหลอดแรก หลอดละ 100 ไมโครลิตร ไปใส่ไว้ที่หลอดทดลองสำหรับปั่นอ่านผล ที่เขียนไว้แล้วให้ตรงกัน

5. หยดเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 3% มีแอนติเจนตรงชนิดแอนติบอดีนั้นๆ ในแต่ละหลอด 50 ไมโครลิตร

6. ผสมให้เข้ากันดี แล้วทำการทดสอบความแรงตามวิธีของ LISS PEG และ MP

7. ปั่นดูการจับกลุ่มและให้คะแนน

วิธีที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดศิริราชตรวจประกอบด้วย

1. Sal-RT อ่านผลที่ อุณหภูมิห้อง 5 นาที และ 60 นาที

2. Sal-IAT อ่านผลที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และที่อุณหภูมิ 37 °ซ. 60 นาที

3. Enzyme อ่านผลที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และที่อุณหภูมิ 37 °ซ. 30 นาที

การอ่านผล

บันทึกผลการตรวจกรองหาแอนติบอดีและผลการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีเป็นคะแนน (score)[8] ความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่มโดย 4+ 3+ 2+ 1+ 1+^{w} trace เท่ากับ 12 10 8 5 4 2 คะแนน ตามลำดับ

ผลการศึกษา

1. ผลการตรวจกรองหาแอนติบอดีในซีรัมผู้บริจาคโลหิตจำนวน 200 ราย ด้วยวิธี LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT พบว่าทั้ง 3 วิธีสามารถตรวจพบแอนติบอดี ได้ 5 ราย (ร้อยละ 2.5) 5 ราย (ร้อยละ 2.5) และ 4 ราย (ร้อยละ 2) ซึ่งได้แก่ anti-Le^{a} anti-Mi^{a} และ anti-M ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งเมื่อเปรียบผลการตรวจ ของ LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P>0.05 ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทั้ง 3 วิธี กับ วิธีที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดศิริราชตรวจซึ่งประกอบด้วย saline-RT saline-IAT และ enzyme พบว่าให้ผลลบเหมือนกัน 192 ราย (ร้อยละ 96) ให้ผลบวกตรงกัน 5

ตารางที่ 1 Antibody detected by LISS, PEG and MP in 200 unknown samples

Antibody specificity	LISS-IAT	PEG-IAT	MP-IAT
Anti-Le^{a}	1	1	1
Anti-Mi^{a}	2	2	1
Anti-M	2	2	2
Total	**5 (2.5%)**	**5 (2.5%)**	**4 (2%)**

ตารางที่ 2 Summary of antibody screening results on 200 unknown samples compared with Siriraj's Results

No.	No. of sample cases (%)	LISS	PEG	MP		Antibody specificity	Siriraj's results		
		IAT	IAT	RT	IAT		Sal-RT	Enzyme	Antibody specificity
1	192 (96%)	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2 (1.0%)	+	+	+	+	Anti-Le^{a}	-	+	Anti-Le^{a}
		+	+	+	+	Anti-Mi^{a}	+	-	Anti-Mi^{a}
3	2 (1.0%)	+	+	+	+	Anti-M	+	-	Anti-M (rechecked)
4	1 (0.5%)	+	+	-	-	Anti-Mi^{a}	+	-	Anti-Mi^{a} (rechecked)
5	1 (0.5%)	+	+	+	+	Unidentified	-	-	Insufficient serum
6	1 (0.5%)	-	-	-	-	NT	+	+	Non-specific antibody
7	1 (0.5%)	-	+	+	+	Non-specific antibody	-	-	- (rechecked)
Total	**200**		**P = 0.105**						

+ = Positive result - = Negative result NT = Not test P = P-value

ราย ซึ่งใน 5 รายนี้ให้ผลบวกตรงกันในตอนแรก 2 ราย คือ anti-Le^a และ anti-Mi^a (No. 2) ส่วนอีก 3 ราย มี 2 รายที่ให้ผลบวกตรงกันทั้ง 3 วิธีแต่ผลของ ศิริราชให้ผลลบซึ่งเมื่อตรวจซ้ำแล้วจึงพบว่าให้ผลบวกเช่นเดียวกัน คือ anti-M (No. 3) และอีก 1 รายให้ผลบวกกับ LISS-IAT และ PEG-IAT แต่ MP-RT กับ MP-IAT และผลของศิริราชให้ผลลบ ซึ่งเมื่อตรวจซ้ำแล้วพบว่าได้ผลบวกที่ LISS-IAT PEG-IAT และผลของศิริราชเท่านั้น ส่วน MP-RT และ MP-IAT ให้ผลลบคือ anti-Mi^a (No. 4) ส่วน No. 5 ไม่สามารถตรวจซ้ำได้เพราะซีรัมไม่พอ และอีก 1 ราย (No. 7) ให้ผลบวกเฉพาะวิธี PEG-IAT MP-RT และ MP-IAT เป็น nonspecific antibody แต่ศิริราชให้ผลลบ ดังแสดงในตารางที่ 2

2. ผลการตรวจ antibody screening ในซีรัมที่ทราบชนิดแอนติบอดี 122 ราย พบว่าให้ผลบวกทั้ง 3 วิธี 101 ราย (ตารางที่ 3) ซึ่งเมื่อนำมาทำ antibody titration และเปรียบเทียบความแรงของ mean score พบว่า การตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Lewis เมื่อใช้ LISS-IAT ได้คะแนน mean score (15.6) สูงที่สุด รองลงไปคือ MP-IAT (11.2) และ PEG-IAT (10.1) ตามลำดับ ส่วน PEG-IAT ให้ความแรงในการตรวจ anti-D anti-E anti-Jk^a anti-Jk^b anti-M และ anti-N ดีกว่าใน MP-IAT และ LISS-IAT ตามลำดับ และ PEG-IAT ยังให้ความแรงในการตรวจ anti-Fy^a anti-Fy^b anti-S anti-Mi^a และ anti-H ดีกว่า LISS-IAT และ MP-IAT ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการนำ mean score ของแอนติบอดีในระบบ Rh Kidd Duffy Lewis และ anti-S ในการหาความแรง มาเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้ง 3 วิธี ส่วน anti-M และ anti-H ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 3 Screening of 122 known antibody samples by LISS, PEG and MP

Antibody specificity	No. / Tested	LISS	PEG	MP	
		IAT	IAT	RT	IAT
Anti-D	16	16	16	16	16
Anti-E	14	14	14	14	14
Anti-Jk^a	4	4	4	3	4
Anti-Jk^b	5	5	5	1	5
Anti-Fy^a	2	2	2	2	2
Anti-Fy^b	2	2	2	2	2
Anti-S	2	2	2	2	2
Anti-Mi^a	25	25	24	24	24
Anti-Le^a	16	14	14	13	14
Anti-Le^b	15	10	10	9	10
Anti-M	5	5	5	5	5
Anti-N	5	1	1	2	1
Anti-H	4	2	2	1	2
Anti-P_1	7	0	0	0	0
Total	**122 (100%)**	**102 (84%)**	**101 (83%)**	**94 (77%)**	**101 (83%)**

ตารางที่ 4 Comparison of mean titration scores among LISS-IAT, PEG- IAT and MP-IAT in 101 samples

Antibody specificity	No. Samples	Mean Titration Scores		
		LISS-IAT	PEG-IAT	MP-IAT
Anti-D	16	74.6	80.7	77.2
Anti-E	14	37.4	54.2	45.6
Anti-Jk^a	4	31.8	44.3	37.3
Anti-Jk^b	5	41.4	61.6	44.8
Anti-Fy^a	2	83.5	88.5	79.5
Anti-Fy^b	2	54.5	63.0	54.0
Anti-S	2	37.0	39.0	32.0
Anti-Le^a + Anti-Le^b	24	15.6	10.1	11.2
Anti-Mi^a	24	47.9	48.5	41.9
Anti-M	5	43.6	55.4	46.4
Anti-N	1	45.0	47.0	46.0
Anti-H	2	37.0	38.0	32.0

ตารางที่ 5 Comparison of P-value of the three techniques (Wilcoxon Signed Ranks test)

Antibody specificity	N	P-value (P)		
		LISS-IAT & PEG-IAT	LISS-IAT & MP-IAT	PEG-IAT & MP-IAT
16 Anti-D, 14 Anti-E, 4 Anti-Jk^a, 5 Anti-Jk^b, 2 Anti-Fy^a, 2 Anti-Fy^b, 2 Anti-S	45	0.000	0.007	0.000
Anti-Mi^a	24	0.840	0.000	0.000
Anti-Le^a & Anti-Le^b	24	0.000	0.000	0.019
Anti-M	5	0.465	0.715	0.225
Anti-H	2	0.317	0.317	0.317

$P < 0.05$ = statistically significant difference $P > 0.05$ = no statistically significant difference

วิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบวิธี LISS PEG และ MP ในการตรวจกรองหาแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงในผู้บริจาคโลหิต 200 ราย เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทั้ง 3 วิธีกับ วิธีที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ศิริราชตรวจซึ่งประกอบด้วย saline-RT saline-IAT และ enzyme พบว่าให้ผลลบเหมือนกัน 192 ราย (ร้อยละ 96) ให้ผลบวกตรงกัน 5 ราย ซึ่งใน 5 รายนี้ให้ผลบวกตรงกันในตอนแรก 2 ราย คือ anti-Le^a และ anti-Mi^a ส่วนอีก 3 ราย มี 2 รายที่ให้ผลบวกตรงกันทั้ง 3 วิธีแต่ผลของศิริราชให้ผลลบ ซึ่งเมื่อตรวจซ้ำแล้วพบว่าให้ผลบวกเช่นเดียวกันคือ anti-M ซึ่งศิริราชให้ผลลบสาเหตุเกิดจากความผิดพลาดของผู้ตรวจ (human error) และอีก 1 รายให้ผลบวกกับ LISS-IAT และ PEG-IAT แต่ MP-RT MP-IAT และของศิริราชให้ผลลบ ซึ่งเมื่อตรวจซ้ำแล้วพบว่าได้ผลบวกที่ LISS-IAT PEG-IAT และของศิริราช เท่านั้น ส่วน MP-RT และ MP-IAT ให้ผลลบคือ anti-Mi^a มี 1 รายที่ไม่สามารถตรวจซ้ำได้เพราะซีรัมไม่พอ และมีอีก 1 ราย ให้ผลบวกเฉพาะวิธี PEG-IAT MP-RT และ MP-IAT เป็น nonspecific antibody แต่ศิริราชให้ผลลบ ดังแสดงในตารางที่ 2

การตรวจกรองหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต 200 ราย ที่ไม่ทราบชนิดแอนติบอดีเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ ที่ได้เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ที่ใช้วิธีปกติทั่วไป (conventional technique) พบว่าวิธี LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลบวก 5 ราย (ร้อยละ 2.5) 5 ราย (ร้อยละ 2.5) และ 4 ราย (ร้อยละ 2) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับ Giblett[11] ที่ได้รายงานไว้ว่าในประชาชนโดยทั่วไปของยุโรป ตรวจกรองพบ unexpected antibodies ด้วยวิธี saline-IAT ร้อยละ 0.32 ใน 312,254 ราย และ ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช และคณะ[12] ได้รายงานการตรวจกรองแอนติบอดีของผู้บริจาคโลหิต ด้วยวิธี saline-IAT ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 10,995 ราย พบร้อยละ 0.4 ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวข้างต้นเป็นเพราะใช้วิธี saline-IAT อย่างเดียว ไม่ได้ใช้ enhancing medium ช่วยเร่งปฏิกิริยาจึงทำให้ตรวจกรองพบได้น้อยกว่าและวิธี saline-IAT อาจจะไม่ไวพอที่จะสามารถตรวจพบ unexpected antibodies บางตัวได้ ยิ่งไปกว่านั้น กาญจนา เอื้อตระกูลพูนสุข และคณะ[13] ได้รายงานการตรวจกรองหาแอนติบอดี ในซีรัมผู้ป่วยที่ขอเลือดจากโรงพยาบาลศิริราช ระหว่าง 1 ตุลาคม 2540 ถึง 30 กันยายน 2541 จำนวน 28,708 ราย พบว่าได้ผลบวก 1,044 ราย (ร้อยละ 3.6) โดยใช้ saline-RT saline-IAT และรวมทั้งวิธี enzyme ด้วย

ในจำนวนแอนติบอดี 122 ราย ที่ทราบชนิดแอนติบอดี มีเพียง 101 ราย ที่ตรวจพบโดยทั้ง 3 วิธีคือ LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT (ตารางที่ 3) จึงนำไปหาความแรง เพื่อเปรียบเทียบความไวของทั้ง 3 วิธีต่อไป แต่แอนติบอดีที่เป็น IgM เช่น anti-Le^a anti-Le^b anti-P_1 anti-Mi^a anti-N และ anti-H ไม่สามารถตรวจพบ ที่ IAT จึงไม่นำมาทำการศึกษาต่อ จำนวน 21 ราย ส่วน anti-Jk^a anti-Jk^b anti-Le^a anti-Le^b ตรวจไม่พบโดยวิธี MP-RT มีจำนวน 1 4 1 และ 1 รายตามลำดับ แต่สามารถตรวจพบโดย วิธี LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT ที่เป็นเช่นนี้เพราะแอนติบอดีกลุ่ม anti-Jk^a anti-Jk^b anti-Le^a anti-Le^b เป็นแอนติบอดีที่เป็น IgG และ anti-P_1 จำนวน 7 ราย ตรวจไม่พบโดยทั้ง 3 วิธีคือ LISS-IAT PEG-IAT และ MP-IAT นั้นเป็นเพราะ anti-P_1 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 2-8 °ซ.

ในการตรวจหาความแรงของแต่ละแอนติบอดี (ตารางที่ 4) พบว่า PEG-IAT มีความไวในการตรวจ IgG antibodies (anti-D anti-E anti-Jk^a anti-Jk^b anti-Fy^a anti-Fy^b และ anti-S) มากกว่า MP-IAT และ LISS-IAT ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Nance และ Garratte[14] ที่ได้รายงานไว้ว่า PEG-IAT มีความไวมากกว่า MP-IAT และ LISS-IAT ในการตรวจ IgG antibodies ที่มีความสำคัญทางคลินิก รวมทั้ง Slater JL และคณะ[15] Shirey และคณะ[16] Barrett และคณะ[17] Low และคณะ[18] และ Combs และคณะ[19] ได้รายงานว่า PEG-IAT มีความไวมากกว่า LISS-IAT ในการตรวจ IgG antibodies นอกจากนี้แล้ว Wenz B[20] และคณะ กับ de Man AJM และคณะ[21] ได้รายงานไว้ว่า PEG-IAT เป็นวิธีที่ไวมากกว่า bovine albumin ในการ detection และ identification ชนิดของ IgG antibodies นอกจากนี้ Jimenez Marco MT และคณะ[22] ได้รายงานเพิ่มเติมว่า PEG-IAT มีความไวมากกว่า LISS-IAT และ bovine serum albumin (BSA-IAT) ในการตรวจแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก และเป็นวิธีที่สามารถยอมรับได้เมื่อนำมาใช้ เป็น routine compatibility test

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Lewis เมื่อใช้ LISS-IAT ได้คะแนน mean score (15.6) สูงที่สุด รองลงไปคือ MP-IAT (11.2) และ PEG-IAT (10.1) ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และ LISS-IAT มีความไว (sensitivity) มากกว่า MP-IAT และ PEG-IAT ในการตรวจกรองหา IgM antibodies โดยเฉพาะในระบบ Lewis ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Reisner และคณะ[23] ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ an-

tibody screening และ identification โดยใช้วิธี PEG albumin และ papain โดยพบว่า PEG ไม่เหมาะที่จะใช้ในการ identification แอนติบอดีในระบบ Lewis และ cold autoantibodies อย่างไรก็ตาม Lalezari P และ Jiang AF[24] ได้รายงานว่าวิธี MP มีความไวมากกว่า antiglobulin test ในการตรวจแอนติบอดีในระบบ ABH MNS Lewis P และ I และ Engelfriet และ Resink[25] ได้กล่าวไว้ว่า ไม่มีวิธีไหนวิธีเดียวที่จะสามารถตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ทั้งหมด

จากตารางที่ 5 พบว่าผลการนำ mean score ของ anti-D anti-E anti-Jk^a anti-Jk^b anti-Fy^a anti-Fy^b anti-S anti-Le^a anti-Le^b มาเปรียบเทียบทางสถิติ ได้ค่า $P< 0.05$ ซึ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันในความแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 3 วิธี ส่วน anti-Mi^a เมื่อเปรียบระหว่าง LISS-IAT กับ PEG-IAT ได้ค่า $P>0.05$ ซึ่งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันในความแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง LISS-IAT กับ MP-IAT และระหว่าง PEG-IAT กับ MP-IAT พบว่ามีความแตกต่างกันในความแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.00$) ส่วน anti-M anti-H ไม่พบความแตกต่างกันในความแรงอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P>0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่าง ในด้านวิธีทดสอบ เวลาที่ใช้ ชนิดของน้ำยา antihuman globulin (AHG) reagent และการอ่านผล ดังนี้

1. ในด้านเวลาที่ใช้ทดสอบพบว่า MP-IAT มีขั้นตอนการทำมากกว่า LISS-IAT และ PEG-IAT แต่ใช้เวลาน้อยกว่า PEG-IAT และ LISS-IAT ตามลำดับ คือ MP-IAT ใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 5-10 นาที แต่ PEG-IAT กับ LISS-IAT ใช้เวลาในการทดสอบ 15-20 นาที และ 20-25 นาที ตามลำดับ

2. การใช้ AHG reagent พบว่า PEG-IAT และ MP-IAT ใช้ monospecific AHG (anti-IgG) จะให้ผลดีกว่า polyspecific AHG (anti-IgG และ anti-C3d) Nance และ Garratty[14] รายงานว่าการใช้ polyspecific AHG ใน PEG-IAT จะทำให้เกิด nonspecific reaction ขึ้นได้เนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกจับด้วย complement และใน polyspecific AHG มี anti-C3d เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ Ferrer และคณะ[26] ได้รายงานไว้ว่าการใช้ monospecific AHG ใน MP-IAT จะช่วยลดปฏิกิริยาของ cold agglutination แต่วิธี LISS การใช้ polyspecific AHG ได้ผลดีในการตรวจหาแอนติบอดีในระบบ Lewis เพราะแอนติบอดีในระบบ Lewis จะจับกับคอมพลีเมนต์ และใน polyspecific AHG มี anti-C3d เป็นส่วนประกอบ

3. ในด้านการอ่านผลพบว่า LISS-IAT และ MP-IAT อ่านผลได้ชัดเจนกว่า PEG-IAT นอกจากนี้ยังพบว่า PEG-IAT ให้ผลบวกปลอมมากกว่าด้วย

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ PEG-IAT เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับตรวจ anti-D anti-E anti-Jk^a anti-Jk^b anti-Fy^a anti-Fy^b anti-Mi^a anti-M anti-S และ anti-H แต่ LISS-IAT เหมาะที่จะใช้สำหรับตรวจ anti-Le^a และ anti-Le^b ส่วนวิธี MP-IAT สามารถตรวจได้ทุกแอนติบอดี แต่ไม่ดีเท่าวิธี LISS-IAT และ PEG-IAT

เอกสารอ้างอิง

1. *Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. Transfusion 1977;17:299-308.*
2. *Spielmann W, Seidl S. Prevalence of irregular red cell antibodies and their significance in blood transfusion and antenatal care. Vox Sang 1974;26:551-9.*
3. *Engelfriet CP, Giles CM. Working party on the standardization of antiglobulin reagents of the expert panel of serology. Vox Sang 1980;38:178-9.*
4. *Petz LD, Garratty G. Antiglobulin sera-past, present and future. Transfusion 1978;18:257-68.*
5. *Wright MS, Issitt PD. Anticomplement and the antiglobulin test. Transfusion 1979;19:688-94.*

6. *Issitt PD. On the incidence of second antibody population in the sera of women who have developed anti-Rh antibodies. Transfusion 1965;5:355-8.*
7. *Issitt PD, et al. Three examples of Rh-positive good responders to blood group antigens. Transfusion 1973;13:316-9.*
8. *Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks 2005:761-3.*
9. *Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks 2005:752-3.*
10. *Brecher ME, editor. Technical manual. 14th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks 2002:690-1.*
11. *Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. Transfusion 1977;17: 299-308.*
12. *Tasanee Sakuldamrongpanich, Jintana Tubrod, and Sarika Mekchay. Development of a solid phase microplate antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. Thai J Hematol Transf Med 2003;13: 119-29.*
13. *Kanchana Outrakoolpoonsuk, Sasitorn Bejrachandra, Jariya Saipin, Wipanee Leehaphaiboonsakun, Varaporn Suratanarungsun, and Pisanupong Plubjuice. Detection of red cell antibodies by enzyme technique. Thai J Hematol Transf Med 1999;9:103-10.*
14. *Nance SJ, Garratty G. A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. Am J Clin Pathol 1987;87:633-5.*
15. *Slater JL, Griswold DJ, Wojtyniak LS, Reisling MJ. Evaluation of the polyethylene glycol-indirect anti-globulin test for routine compatibility testing. Transfusion 1989;29:686-8.*
16. *Shirley RS, Boyd JS, Ness PM. Polyethylene glycol versus low-ionic-strength solution in pre-transfusion testing: a blinded comparison study. Transfusion 1994;34:368-70.*
17. *Barrett VJ, et al. Analysis of the routine use of polyethylene glycol (PEG) as an enhancement medium. Immunohematology 1995;11:11-3.*
18. *Low KS, et al. Improved detection of weak, clinically significant antibodies by supplementation of polyethylene glycol with a low-ionic solution. Immuno-hematology 1998;14:68-71.*
19. *Combs MR, et al. Selecting an acceptable and safe antibody detection test can present a dilemma. Immunohematology 2001;17:86-9.*
20. *Wenz B, Apuzzo J. Polyethylene glycol improves the direct antiglobulin test. Transfusion 1989;29:218-20.*
21. *de Man AJM, Overbeeke MAM. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test for detection of red blood cell antibodies. Vox Sang 1990;58:207-10.*
22. *Jimenez MT, Hernandez MD, Rodriguez de la Rua A, et al. Evaluation of the polyethylene glycol antiglobulin test in the detection and identification of erythrocyte antibodies. Sangre (Barc) 1998;43:21-4.*
23. *Reisner R, Butter G, Bundy K, Moore SB. Comparison of the polyethylene glycol antiglobulin test and the use of enzymes in antibody detection and identification. Transfusion 1996;36:487-9.*
24. *Lalezari P, Jiang AF. The manual polybrene test: A simple and rapid procedure for detection of red blood cell antibodies. Transfusion 1980;20:206-11.*
25. *International Forum: What is the best technique for the detection of red cell alloantibodies? Vox Sang 1995;69:292-300.*
26. *Ferrer Z, Wright J, Moore BPL, Freedman J. Comparison of a modified manual hexadimethrine bromide (Polybrene) and a low-ionic-strength solution antibody detection technique. Transfusion 1985; 25:145-8.*

Comparison of Low Ionic Strength Solution, Polyethylene Glycol and Manual Polybrene for Antibody Detection[1]

Udom Tingtoy, Sasitorn Bejrachandra*,

Tasanee Sakuldamrongpanich, and Jariya Saipin*

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

**Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok*

Abstract : *The sensitivity of the antibody detection technique is important in providing compatible blood. In cases that a pattern of weak reactions fails to indicate specificity, or the presence of an antibody is suspected but cannot be demonstrated, the use of enhancing reagents may be helpful.* ***Objectives :*** *The purpose of this study was to compare low ionic strength solution (LISS), polyethylene glycol (PEG) and manual polybrene (MP) techniques for enhancing antibody detection in indirect antiglobulin testing (IAT).* ***Material and methods :*** *Antibody screening was performed in 200 unknown donor blood samples in parallel. The antibody screening was also performed in 122 samples of known antibody specificities, of which these samples gave positive results by all techniques. The antibody titration was performed on these samples to compare the sensitivity of the assays. Results: The results were evaluated by Wilcoxon Signed Ranks test. The positive results of antibody screening performed in the 200 unknown samples, using LISS-IAT, PEG-IAT and MP-IAT techniques, were found in 5(2.5%), 5(2.5%) and 4(2%) samples, respectively. The results evaluated by Friedman test showed no significant difference among LISS, PEG and MP techniques (P>0.05). In addition, titration studies were performed on 101 samples of known antibody specificities. Comparison of mean scores of the three techniques demonstrated that LISS-IAT (15.6) gave a higher mean score in detecting anti-Le^{a} and anti-Le^{b} than the MP-IAT (11.2) and the PEG-IAT (10.1), respectively. However, the PEG-IAT showed a higher mean scores in detecting anti-D, anti-E, anti-Jk^{a}, anti-Jk^{b}, anti-M and anti-N than the MP-IAT and the LISS-IAT, respectively. Furthermore, PEG-IAT had a higher mean score in detecting anti-Fy^{a}, anti-Fy^{b}, anti-S, anti-Mi^{a} and anti-H than LISS-IAT and MP-IAT, respectively.* ***Conclusion :*** *The PEG-IAT is the best in all technique systems for antibody detection. But the LISS-IAT is the better technique for antibody detection in Lewis system.*

Key Words : ● *Antibody screening LISS PEG MP*

Thai J Hematol Transf Med 2008;18:21-30.

[1]*A part of the thesis for the degree of master of science (transfusion science) Faculty of Medicine Siriraj Hospital Mahidol University of Udom Tingtoy SITS/M 4437490*