นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจกรองและการแยกหาชนิดแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต

ทนงศักดิ์ ยีละ[1]
วาสนา บัวทอง[2]

Abstract:

Screening and identification of irregular antibodies in blood donation

Yeela T, Buathong W.

Department of Pathology, Faculty of Medicine,

Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand

Songkla Med J 2004;22(2):89-93

The antibody screening of 26,527 blood donors at Songklanagarind Hospital was analyzed. The saline technique found 265 samples were positive, accounting for identification of irregular antibodies in the positive sample was studied by panel cell. Anti-Le^a, anti-Le^b, anti-Le^{a+b}, anti-Mi^a, anti-P_1, anti-E and anti-c were detected in 111, 55, 72, 4, 13, 2 and 1 samples respectively. Confirmation of the results was obtained by red cell typing, which used an in-house antibody prepared from donated plasma with a known antibody. The known antibody plasma was stock in aliqouts at -20 ^oC for red cell typing. Antibody identification in donated blood is very useful for patients. The in-house antibody reduced the hospital cost because commercial antibodies are very expensive, about 1,000 baht/ml.

Key words: *antibody screening, antibody identification, blood donation*

---

[1]ป. พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์, พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ [2]วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (ชีวเคมี), นักเทคนิคการแพทย์
หน่วยคลังเลือด ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
รับต้นฉบับวันที่ 15 สิงหาคม 2546 รับลงตีพิมพ์วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2547

บทคัดย่อ:

ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดชนิดอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากระบบ ABO จากผู้บริจาคโลหิตที่หน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2544 ถึงเดือนธันวาคม 2545 จำนวน 26,527 ราย ซึ่งการตรวจกรองแอนติบอดีใช้วิธี saline และใช้ screening cell ของสภากาชาดไทย พบว่า ให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีบวก 265 ราย จากนั้นนำมาแยกหาชนิดแอนติบอดี โดยใช้ชุด panel cell ของสภากาชาดไทย ได้เป็นแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คือ anti-Le^a 111 ราย, anti-Le^b 55 ราย, anti-Le^{a+b} 72 ราย, anti-Mi^a 7 ราย, anti-M 4 ราย, anti-P_1 13 ราย, anti-E 2 ราย และ anti- c 1 ราย ยืนยันความถูกต้องของแอนติบอดีที่ตรวจพบโดยการทำ red cell typing ใช้แอนติบอดีที่เตรียมขึ้นเองมาทดสอบซึ่งได้จากพลาสมาของผู้บริจาคโลหิตที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วและนำมาทำเป็นซีรั่มก่อนนำไปทดสอบ จากการทดสอบให้ผลถูกต้อง และได้ทำการแยกเก็บพลาสมาของตัวอย่างทดสอบที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในงานสำหรับทำ red cell typing ซึ่งจากการแยกหาชนิดแอนติบอดีในเลือดผู้บริจาค ทำให้สามารถนำเลือดไปให้ผู้ป่วยที่มี irregular antibody ได้อย่างมีคุณภาพและปลอดภัย และจากการเตรียมแอนติบอดีขึ้นใช้เองนี้ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายอย่างมาก เพราะแอนติบอดีที่สั่งซื้อจากบริษัทจะมีราคาแพงมาก ประมาณ 1,000 บาท/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: *การตรวจกรองแอนติบอดี, การแยกชนิดแอนติบอดี, ผู้บริจาคโลหิต*

บทนำ

โดยทั่วไปแล้วคนปกตินอกจากจะพบแอนติบอดีในระบบ ABO แล้ว ยังสามารถพบแอนติบอดีของหมู่เลือดระบบอื่น ๆ ที่เรียกว่า unexpected antibody หรือ irregular antibody ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (naturally antibody) เนื่องจากร่างกายได้รับสารที่มีคุณสมบัติคล้ายแอนติเจน หรือเกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune antibody) อาจจะโดยถูกกระตุ้นจากการรับเลือด การตั้งครรภ์ หรือการปลูกถ่ายอวัยวะ

การตรวจหาว่าผู้บริจาคโลหิตมีแอนติบอดีต่อหมู่เลือดใดบ้างจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วย เพราะสามารถจัดเตรียมเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย นอกจากนี้ยังสามารถเก็บพลาสมาของผู้บริจาคโลหิตที่มี unexpected antibody นำมาใช้ประโยชน์ในงานคลังเลือด เพื่อทำการทดสอบหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง (red cell typing) ซึ่งจะเป็นการประหยัด ลดต้นทุนในการซื้อน้ำยาของบริษัทซึ่งมีราคาแพงมากมาทดสอบ

วัสดุและวิธีการ

ใช้ตัวอย่างเลือด clotted blood ของผู้บริจาคโลหิต หน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ตั้งแต่มกราคม 2544 ถึงธันวาคม 2545 จำนวน 26,527 ราย โดยตัวอย่างทั้งหมดทำการตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) ใช้เซลล์ pool O ของสภากาชาดไทย เมื่อให้ผลบวกนำมาตรวจซ้ำอีกครั้งโดยใช้เซลล์ pool O_1, O_2 ของสภากาชาดไทย และเซลล์ pool O ที่ถูก treat ด้วยเอนไซม์ปาเปน เมื่อให้ผลบวกจึงนำมาตรวจแยกชนิดแอนติบอดี (antibody identification) โดยใช้ชุด panel cell จากสภากาชาดไทย วิธี saline

เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดสอบเป็น pool O, เซลล์ O_1, O_2 ซึ่งซื้อจากสภากาชาดไทยจะมีแอนติเจนบนเม็ดเลือดที่สำคัญ ๆ ได้แก่ C, c, D, E, e M, N, S, s, Mi^a, Fy^a, Fy^b, Jk^a, JK^b, P_1, Di^a, Di^b, Le^a และ Le^b เป็นต้น[1, 2] โดยทำการเตรียมให้มีความเข้มข้น 2-5% เซลล์ในน้ำเกลือปกติ 0.85% normal saline (NSS)

เซลล์ pool O ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยการนำเอนไซม์ปาเปน 1 ส่วน ผสมกับ phosphate buffer pH 7.3 9 ส่วน จากนั้นนำส่วนผสมนี้ 4 ส่วน ผสมกับ packed pool O cell 1 ส่วน นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 25 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย NSS 3 ครั้ง แล้วทำเป็น 2-5% cell suspension

วิธีการทดสอบ

1. การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening test) โดยใช้เซลล์ pool O[3]

1.1 หยดซีรั่มที่จะทดสอบลงในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร หลอดละ 2 หยด แล้วหยด 2-5% เซลล์ pool O 1 หยด วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที ปั่น 15 วินาที (3,400 รอบ/นาที) อ่านผลปฏิกิริยา แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C 30 นาที ปั่นอ่านปฏิกิริยานำไปล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือธรรมดา (0.85% normal saline) ครั้งสุดท้ายซับให้แห้ง

หยดน้ำยา anti human globulin (จากสภากาชาดไทย) 2 หยด อ่านปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า ถ้าให้ผลลบนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.2 ตัวอย่างรายใดที่ให้ผลบวกในข้อ 1.1 นำมาทดสอบกับเซลล์ O_1, O_2 และเซลล์ pool O ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์[4] โดยทำวิธีเดียวกันกับข้อ 1.1

การแปลผล

ผลลบ เมื่อเขย่าหลอดไม่เห็นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ผลบวก เมื่อเขย่าหลอดยังเห็นการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

2. การตรวจแยกชนิดแอนติบอดี (antibody identification)

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในข้อ 1.2 จะนำมาตรวจแยกชนิดแอนติบอดี[3] โดยใช้ชุด panel cell ของสภากาชาดไทยซึ่งในแต่ละชุดจะมี 11 ขวด ดังนั้นในการทดสอบแต่ละครั้งต้องใช้หลอดทดลอง 11 หลอด หยดซีรั่มที่จะทดสอบใส่หลอด ๆ ละ 2 หยด จากนั้นหยดชุด panel cell ซึ่งทำเป็น 2-5% cell suspension หลอดละ 1 หยด วิธีการทดสอบและการอ่านปฏิกิริยาเหมือนข้อ 1

การแปลผล เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จาก key ที่ให้มากับชุด panel cell เพื่อแยกชนิดของแอนติบอดี

3. การทดสอบหาชนิดแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (red cell typing)[5]

ตัวอย่างที่ทราบชนิดแอนติบอดีที่ได้จากการทดสอบในข้อ 2 จะนำมาตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของการตรวจแยกชนิดแอนติบอดี โดยการนำเซลล์ของตัวอย่างที่ทราบชนิดแอนติบอดีมาทำเป็น 2-5% cell suspension ทดสอบกับแอนติ-ซีรั่มที่เป็นชนิดเดียวกับแอนติบอดีที่ตรวจพบในซีรั่มรายนั้น โดยแอนติซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบได้จากซีรั่มผู้บริจาคโลหิตที่ทราบชนิดแอนติบอดี ซึ่งการทดสอบใช้ 2-5% cell suspension ที่จะทดสอบ 1 หยด ผสมกับซีรั่มที่มีแอนติบอดีชนิดเดียวกับเซลล์ที่ต้องการทดสอบนั้น 2 หยด ปั่นอ่านผลปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง หรืออ่านผลที่ปฏิกิริยา indirect antiglobulin test ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนที่ต้องการทราบชนิด

การแปลผล

ถ้าให้ผลลบ แสดงว่าการตรวจหาชนิดของแอนติ-บอดีนั้นถูกต้อง เพราะถ้าพบแอนติบอดีในซีรั่ม แสดงว่ารายนั้นจะต้องไม่มีแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง[6]

ถ้าให้ผลบวก แสดงว่าแอนติบอดีที่คาดว่าจะเป็นชนิดนั้นไม่ถูกต้อง จะต้องทำ positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

4. การเก็บตัวอย่างที่ให้ผลบวกแรงไปใช้ในงานสำหรับ red cell typing

ซีรั่มรายใดที่พบแอนติบอดีให้ความแรงของปฏิกิริยา screening antibody $\geq 2^+$ จะทำการแยกเก็บเพื่อใช้งาน โดยจะนำพลาสมา (plasma) ประมาณ 150-200 ml ที่แยกเก็บหลังจากการปั่น packed red cell มาขจัดเอา fibrin ออกจาก plasma เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกปลอมโดยการใส่แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ประมาณ 1-2 กรัม คนให้ $CaCl_2$ ละลายจนหมดนำไป incubate ที่ 37 ^oC ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จน fibrin จับตัวเป็นก้อน แล้วนำไปแช่ในตู้เย็น 4 ^oC 1 คืน หลังจากนั้นเขี่ยให้ก้อน fibrin ออกจนหมดจึงได้ซีรั่ม แบ่งเป็น aliqout นำไปแช่แข็งที่ -20 ^oC เมื่อต้องการใช้งานจึงนำมาละลาย

ผลการศึกษา

1. การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) ในผู้บริจาคโลหิต จำนวน 26,527 ราย โดยใช้เซลล์ pool O, เซลล์ O_1, O_2 และ เซลล์ pool O ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

เมื่อนำตัวอย่างมาทดสอบกับเซลล์ pool O เมื่อให้ผลบวกจึงนำมาทดสอบกับเซลล์ O_1, O_2 และเซลล์ pool O ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ผลการทดสอบจากตารางที่ 1 พบว่าจากจำนวนผู้บริจาคโลหิต 26,527 ราย พบว่าเป็น หมู่ A ร้อยละ 23.9, หมู่ B ร้อยละ 29.4, หมู่ O ร้อยละ 39.7 และหมู่ AB ร้อยละ 7 และให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีบวกรวมทั้งสิ้น 265 ราย แยกตามหมู่เลือด A, B, O และ AB ดังนี้ 79, 110, 50 และ 26 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 29.8, ร้อยละ 41.5, ร้อยละ 18.9, และร้อยละ 9.8 ตามลำดับ

2. การตรวจแยกชนิดแอนติบอดี (antibody identification)

จากตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผล antibody screening บวก นำมาทดสอบแยกหาชนิดแอนติบอดี โดยใช้ชุด panel cell ของสภากาชาดไทย ผลการทดสอบจากตารางที่ 2 พบว่า จากตัวอย่าง 265 ราย ที่ให้ผล antibody screening บวก สามารถแยกได้เป็นแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ดังนี้ anti-Le^a 111 ราย, anti-Le^b 55 ราย, anti-Le^{a+b} 72 ราย, anti-Mi^a 7 ราย, anti-P_1 13 ราย, anti-M 4 ราย anti-E 2 ราย และ anti-c 1 ราย

ตารางที่ 1 การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) ตั้งแต่เดือนมกราคม 2544 ถึงธันวาคม 2545 จำนวน 26,527 ราย

หมู่เลือด	จำนวนผู้บริจาคที่ทำการทดสอบ (ราย)	คิดเป็นร้อยละ	ผล antibody screening บวก (ราย)	คิดเป็นร้อยละ
A	6,337	23.9	79	29.8
B	7,753	29.4	110	41.5
O	10,556	39.7	50	18.9
AB	1,881	7	26	9.8
รวม	**26,527**	**100**	**265**	**100**

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีจากเลือดผู้บริจาคที่ให้ผล antibody screening บวก จำนวน 265 ราย

หมู่เลือด	ชนิดแอนติบอดีที่พบ								
	Le^a	Le^b	Le^{a+b}	Mi^a	M	P_1	E	c	รวม
A	24	19	32	3	–	1	–	–	79
B	42	30	27	2	1	6	1	1	110
O	37	–	4	2	2	4	1	–	50
AB	8	6	9	–	1	2	–	–	26
รวม	**111**	**55**	**72**	**7**	**4**	**13**	**2**	**1**	**265**

3. การทดสอบหาชนิดของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง (red cell typing)

นำตัวอย่างที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วมาทำการตรวจหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มชนิดนั้น ๆ ซึ่งแอนติบอดีนี้ได้จากการจัดเก็บแอนติบอดีขึ้นมาใช้เองในหน่วยคลังเลือด โดยได้มาจากการตรวจหาแอนติบอดีของผู้บริจาคโลหิต จากตัวอย่างเลือดที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้วนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่ม ให้ผลยืนยันที่ถูกต้อง เนื่องจากในซีรั่มที่ตรวจพบแอนติบอดีชนิดหนึ่งบนเซลล์เม็ดเลือดแดงของระบบเดียวกันนั้นจะไม่พบแอนติเจนคือจะให้ผลที่เป็นลบ

วิจารณ์

การตรวจกรองแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิตโดยใช้เซลล์ pool O ในขั้นตอนแรกจะเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมาก เพราะจากการทดสอบเลือดผู้บริจาคโลหิตจำนวน 26,527 ราย ให้ผลบวกเพียง 265 ราย หรือประมาณร้อยละ 1 ของจำนวนเลือดที่ทดสอบ จากนั้นนำเลือดที่ให้ผลบวกมาทดสอบอีกครั้ง โดยใช้เซลล์ O 1 และ O 2 และเซลล์ pool O ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้ทั้งวิธี saline และเอนไซม์ เนื่องจากเพื่อให้แน่ใจว่าการทดสอบนั้นให้ผลบวกจริงซึ่งเมื่อให้ผลบวกแล้วจึงนำมาแยกหาชนิดแอนติบอดี และจากจำนวน 265 ราย ที่ให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีบวก เมื่อนำมาแยกชนิดแอนติบอดีพบว่าส่วนใหญ่เป็นหมู่เลือด B จำนวน 110 ราย และเป็นแอนติบอดีในระบบ cold type รวมทั้งสิ้นจำนวน 262 ราย เรียงลำดับจากการพบมากไปหาน้อย ได้แก่ anti-Le^a, anti-Le^{a+b}, anti-Le^b, anti-P_1, anti-Mi^a, anti-M และแอนติบอดีในระบบ warm type พบเพียง 3 ราย ได้แก่ anti E และ anti-c ซึ่งทั้งหมด 265 ราย ได้ทำการทดสอบหาชนิดแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (red cell type) เพื่อยืนยันการทดสอบว่าแอนติบอดีที่พบนั้นถูกต้อง ซึ่งการทดสอบ red cell typing นั้นแอนติบอดีที่นำมาทดสอบเป็นแอนติซีรั่มที่แช่แข็งเก็บไว้ในคลังเลือด ซึ่งได้จากเลือดผู้บริจาคที่ทราบชนิดแอนติบอดีแล้ว มีเพียง anti-c

ชนิดเดียวที่ต้องใช้แอนติซีรั่มจากบริษัทซึ่งจาก 265 ราย พบเพียง 1 ราย การที่ใช้แอนติซีรั่มที่ทำขึ้นเองจะเป็นการประหยัดอย่างมาก และให้ผลการทดสอบถูกต้อง เพราะการทดสอบแต่ละครั้งจะมี negative และ positive control ควบคู่ไปด้วย

ดังนั้นการที่ทำการตรวจหาแอนติบอดีในผู้บริจาคโลหิต นอกจากจะเป็นประโยชน์ในการหาเลือดให้ผู้ป่วยที่มี irregular antibody แล้ว ยังสามารถแช่แข็งเก็บซีรั่มของผู้บริจาคโลหิตที่ทราบชนิดแอนติบอดีไว้ใช้งานทางคลังเลือด ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายอย่างมากเพราะใช้แทนแอนติซีรั่มที่สั่งซื้อจากบริษัทที่มีราคาค่อนข้างแพงประมาณ 1,000 บาท/มิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละเดือนจะมีผู้ป่วยที่มี irregular antibody ประมาณ 80 ราย แต่ละรายจะต้องนำเลือดมาเพื่อทำ red cell typing เพื่อหาเลือดให้ผู้ป่วยประมาณ 10 ยูนิต เฉลี่ยแล้วต้องทำ red cell typing เดือนละ 800 ยูนิต ใช้แอนติซีรั่มประมาณ 40 มิลลิลิตร ซึ่งการที่ใช้แอนติซีรั่มที่ทำขึ้นเองทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้ถึงเดือนละประมาณ 40,000 บาท

สรุป

การตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) การตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) และการหาชนิดแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (red cell typing) ในผู้บริจาคโลหิตนอกจากผู้ป่วยจะได้รับประโยชน์ในการที่สามารถจะได้รับเลือดที่รวดเร็วและปลอดภัยแล้ว ยังเป็นการประหยัดการใช้งบประมาณในการซื้อแอนตีซีรัมบางชนิดด้วย เพียงแต่มีข้อจำกัดจากแอนติซีรั่มบางรายไม่สามารถทำ red cell typing ของผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่เลือดระบบ ABO ไม่เข้ากัน แต่สามารถแก้ปัญหาโดยการเก็บซีรั่มไว้หลาย ๆ ราย เพื่อให้สามารถครอบคลุมเลือดได้ทุกหมู่ตามความจำเป็น และเหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

1. Miller WV, editor. Technical manual. 7th ed. Washington, DC: American Association of Blood Bank; 1977.
2. Myhre BA. Quality control in blood banking. New York: Wiley; 1974.
3. Vengelen-Tyler V, editor. Technical manual. 13th ed. Maryland: American Association of Blood Bank; 1999.
4. นุชรัตน์ วรรณพงศ์. คู่มือการเตรียมสารละลาย. สงขลา: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2541.
5. ทัศน์ยานี จันทนยิ่งยง. เวชศาสตร์การธนาคารเลือด. กรุงเทพมหานคร: ธรรกมลการพิมพ์; 2541.
6. ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. เทคนิคทางคลังเลือด. ขอนแก่น: ฝ่ายผลิตเอกสารสำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2526.