



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธีโฟลไซโทเมตริกแอนติโกลบูลินเทสสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้

โดย นายยุทธนา หมั่นดี และคณะ

วันที่ 17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การพัฒนาวิธีโพลีไซโทเมตริกแอนติโกบูลินเทสสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. ผศ. ดร. ยุทธนา หมั่นดี | ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 2. ผศ. พญ. พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ | ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. อ. ลัดดา ฟองสถิตย์กุล | หน่วยเก็บรักษาและบริการ งานธนาคารเลือด
โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 4. ศ. ดร. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ | สถานส่งเสริมการวิจัย ตึกอดุลยเดชวิกรม ชั้น 11
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2546 ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) โดยมีผู้ร่วมวิจัยที่เป็นกุมารแพทย์ 1 ท่าน และเป็นเทคนิคการแพทย์ 1 ท่าน ที่ให้การสนับสนุนด้านการจัดเก็บตัวอย่างเลือด ทั้งเลือดของคนปกติและของผู้ป่วย ตามลำดับ และมี ศาสตราจารย์ ดร.โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์ ซึ่งผู้เชี่ยวชาญด้านโพลีไซโทเมตรี ให้ความกรุณาตอบรับเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง ที่ได้ให้ทั้ง แนวคิด หลักการ และเหตุผล ในการทำวิจัย นอกจากนี้ยังช่วย แนะนำ แก้ปัญหา ชี้แนวทางการแปลผล และสรุปผลการศึกษา ให้อีกด้วย

คณะผู้วิจัยจึงต้องขอขอบพระคุณ สกว. สกอ. และนักวิจัยพี่เลี้ยง เป็นอย่างสูง และต้องขอขอบคุณ คลินิกผู้ป่วยนอก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ หน่วยเก็บรักษาและบริการ งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในการจัดเก็บตัวอย่างเลือด และกรุณาอนุญาตให้ใช้เครื่องมือวิจัย ที่จำเป็นหลายอย่าง โดยเฉพาะเครื่องโพลีไซโทมิเตอร์ และที่สำคัญที่สุด ต้องขอขอบคุณ ผู้บริจาคเลือด และผู้ป่วย ที่ยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปมาใช้ในการวิจัยนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG4680015

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีโพลีไซโทเมตริกแอนติโกลบูลินเทสสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้

ชื่อนักวิจัย ดร.ยุทธนา หมั่นดี

ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail address yuttana@chiangmai.ac.th หรือ myuttana@hotmail.com

ระยะเวลา 2 ปี (ระหว่างวันที่ 1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548)

โพลีไซโทเมตริกเป็นวิธีการทันสมัยที่ใช้ตรวจนับเซลล์อิสระ หรืออนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวที่ไหลผ่านแสงเลเซอร์เป็นแถวเรียงเดียว วิธีการนี้มีข้อดีกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง และ/หรือ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง เช่น ตรวจนับเซลล์เป็นจำนวนมาก ใช้เวลาน้อย ผลการตรวจแม่นยำแน่นอนไม่แปรเปลี่ยนไปตามความรู้และความชำนาญของผู้ตรวจ และมีความน่าเชื่อถือสูง แอนติโกลบูลินเทสเป็นวิธีการยอดเยี่ยม ในการตรวจหาแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง ที่เรียกว่าแอนติโกลบูลินเทสทางตรง และยังใช้ตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงได้ ที่เรียกว่าแอนติโกลบูลินเทสทางอ้อม การตรวจแอนติโกลบูลินเทสทั้งทางตรงและทางอ้อม มีประโยชน์สูงในการตรวจวินิจฉัยและติดตามการรักษา โรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง และโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง การตรวจแอนติโกลบูลินเทสทั้งทางตรงและทางอ้อมนี้ สามารถปรับไปใช้วิธีโพลีไซโทเมตริกในการตรวจนับได้ ทั้งการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด สำหรับการตรวจนับเม็ดเลือดแดงนั้น สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน คือ ใช้เม็ดเลือดแดงที่แขวนลอยในตัวกลางไอโซโทนิกบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์สาลายที่มีอัลบูมินของวัวละลายอยู่ร้อยละ 1 หลังจากนั้นให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ เอฟเอบีพายสองแอนติฮิวแมนโกลบูลิน ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสงชนิด ฟลูออเรสซินไอโซไทโอไซยานเท (เรืองแสงสีเขียว ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร) ในอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นเติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์สาลายที่มีฟอร์มาลดีไฮด์ละลายอยู่ร้อยละ 1 แล้วจึงตรวจนับเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียวด้วยโพลีไซโทเมตริก สำหรับการตรวจนับเกล็ดเลือดนั้น สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน เหมือนกันกับการตรวจเม็ดเลือดแดง แต่ใช้เกล็ดเลือด ในการทำปฏิกิริยาแทน สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ ให้ค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสง (MFI) ที่ได้จากผู้ป่วย แตกต่างจากที่ได้จากคนปกติอย่างชัดเจน ค่าการตรวจทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ แอนติโกลบูลินเทสทางตรงของเม็ดเลือดแดง (E-DAT) แอนติโกลบูลินเทสทางอ้อมของเม็ดเลือดแดง (E-IAT) แอนติโกลบูลินเทสทางตรงของเกล็ดเลือด (T-DAT) และแอนติโกลบูลิน

ลินเทสทางอ้อมของเกล็ดเลือด (T-IAT) ใช้วิธีการตรวจที่คล้ายกัน และใช้น้ำยาตรวจชุดเดียวกัน ต่อจากนั้นใช้น้ำยาตรวจและวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้ ตรวจหาค่าการตรวจทั้ง 4 ใน ผู้ป่วยโรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง (AIHA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง (AITP, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (routmatoid arthritis , RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases, NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ที่ได้มาจาก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม 2547 ถึง เดือนมิถุนายน 2550 โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์จาก บริษัท เบคแมน คูลเตอร์ รุ่น อีปีคซ์ เอ็กซ์แอล ตั้งช่องรับสัญญาณสีเขียวที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร การกระเจิงของแสงด้านข้าง และด้านตรง พบว่าค่า MFI ของการตรวจ E-DAT และ E-IAT ที่ได้จากผู้ป่วย AIHA มีค่าสูงกว่า ค่า MFI ที่ได้จากผู้ป่วย AITP, RA, NAD และในคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ ค่า MFI ของการตรวจ E-DAT และ E-IAT ที่ได้จากผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ยังพบว่าค่า MFI ของการตรวจ T-DAT และ T-IAT ที่ได้จากผู้ป่วย AITP มีค่าสูงกว่า ค่า MFI ที่ได้จากผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ ค่า MFI ของการตรวจ T-DAT และ T-IAT ที่ได้จากผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีโฟลไซโทเมตริกแอนติโกบูลินเทส สำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดง หรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่ และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้ ที่พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรค AIHA และ AITP ได้ เนื่องจากค่า MFI ของผู้ป่วยดังกล่าว มีค่าสูงกว่า MFI ผู้ป่วยในกลุ่มอื่นๆ และในคนปกติอย่างชัดเจน นอกจากนี้วิธีการนี้ยังสามารถใช้ตรวจหา ปฏิกริยาหลังการเติมเลือด โรคเม็ดเลือดแดงสลายในเด็กแรกคลอด การตรวจหาหมู่เลือด และการตรวจความเข้ากันได้ของเลือด ได้อีกด้วย

คำหลัก โฟลไซโทเมตริก แอนติโกบูลินเทส โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด

Abstract

Project Code MRG4680015

Project title Development of flow cytometric antiglobulin test for enumeration of antibody-associated erythrocytes or thrombocytes and determination of erythrocyte- or thrombocyte-bindable antibodies in serum or plasma

Investigators Dr.Yuttana Munde

Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

E-mail address yuttana@chiangmai.ac.th or myuttana@hotmail.com

Project Period 2 years (from July 1, 2002 to June 30, 2005)

Flow cytometry (FC) is a modern technique for enumeration of free cells or particles that suspended in fluid and flowing through a beam of laser in a cell by cell manner. The technique has superior advantages over light and/or fluorescent microscopy such as higher number of counted cells, shorter time consuming, objective measurement and more reliability. Antiglobulin test (AGT) is a test of choice for demonstration of antibodies on cell surface called direct antiglobulin test (DAT) and antibodies in serum called indirect antiglobulin test (IAT). Both DAT and IAT are highly benefited on diagnosis and follow up of auto-immune hemolytic anemia (AIHA) and auto-immune thrombocytopenia purpura (AITP). Both DAT and IAT can be modified for flow cytometry using erythrocytes or thrombocytes as target particles to be measured. We developed a simple flow cytometric antiglobulin procedure for determination of auto-antibodies on erythrocytes and thrombocytes. The optimal conditions for erythrocyte procedure were as follows. Five percent erythrocyte suspension was incubated with serum at the ratio of 1:2 at 37°C for 30 min then the cells were washed 3 times with 1% bovine serum albumin in phosphate buffer saline (1% BSA-PBS). After that, F(ab')₂ anti-human globulin conjugated fluorescein isothiocyanate (AHG-FITC) was added, then the suspension was mixed and incubated at room temperature (RT) for 30 min in the dark. Finally 1% formaldehyde in 1% BSA-PBS was added. The suspension was ready to be enumerated by flow cytometer. The optimal conditions for thrombocyte procedure were similar to that of the erythrocytes but 5% platelet suspension was used instead of 5% erythrocyte suspension. These optimal conditions gave a satisfied discrimination of mean fluorescent intensity (MFI) obtaining from patient and from normal healthy control sera. All 4 parameters of erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT), erythrocyte indirect

antiglobulin test (E-IAT), thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT) and thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT) can be obtained from similar procedure using the same reagents. In addition, these 4 parameters in patients with AIHA (n = 50), AITP (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 50), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and in normal healthy blood donor (Normal, n = 50) obtained from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, between January 2004 to June 2007 were tested using the developed procedure. Beckman-Coulter Epic-XL (USA) flow cytometer was used with 530 nm fluorescent, side- and forward-scatter detectors. The mean fluorescent intensity (MFI) of E-DAT & E-IAT of patients with AIHA were significantly higher than those of AITP, RA, NAD and Normal ($p < 0.05$). While the MFI of E-DAT & E-IAT of RA, NAD and Normal were not significantly different. The mean fluorescent intensity (MFI) of T-DAT & T-IAT of patients with AITP were significantly higher than those of RA, NAD and Normal ($p < 0.05$). While the MFI of T-DAT & T-IAT of RA, NAD and Normal were not significantly different. The developed flow cytometric antiglobulin test for enumeration of antibody-associated erythrocytes or thrombocytes and determination of erythrocyte- or thrombocyte-bindable antibodies in serum or plasma can be used for diagnosis of AIHA and AITP. Since the MFI of the patients were higher than those of the other group. Apart from that flow cytometric antiglobulin procedure describing here can possibly be applied for transfusion reaction, hemolytic disease of the newborn and blood group determination and pre-transfusion testing (compatibility test or cross matching).

Keywords Flow cytometry, Antiglobulin test, Auto-immune diseases, Erythrocyte, Thrombocyte.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	XI
สารบัญอักษรย่อ	XII
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	7
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์	56
สรุป	64
เอกสารอ้างอิง	65
ผลที่ได้รับจากโครงการ	68
ภาคผนวก	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของการล้าง Erythrocytes	19
2. เปรียบเทียบระยะเวลาการนับครบ 50,000 ของ % RBC Suspension	20
3. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ % RBC Suspension	20
4. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของปริมาตร Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate (AHG-FITC) ที่ dilute 1:10	21
5. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของอนุภาคที่จับกับ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate	21
6. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาที่จับกับ Anti- Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate	22
7. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของความเข้มข้น (%) ของ Formaldehyde	23
8. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการเก็บ RBC ไว้ใน ตู้เย็น ก่อนการทำ Flow Cytometry	23
9. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ Serum Dilution ที่ใช้ทำ ปฏิกิริยากับ 0.5% Erythrocyte Suspension	24
10. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) อนุภาคที่จับกับ Serum กับ 0.5% Red Blood Cell Suspension	25
11. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการบ่ม Serum กับ 0.5% Red Blood Cell Suspension	25

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของการล้าง Thrombocytes	26
13. เปรียบเทียบระยะเวลาการนับครบ 50,000 ของ % Platelet Suspension	26
14. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ % Platelet Suspension	27
15. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของปริมาตร Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate (AHG-FITC) ที่ dilute 1:10	28
16. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของอุณหภูมิที่ใช้กับ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate	28
17. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาที่ใช้กับ Anti- Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate	29
18. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของความเข้มข้น (%) ของ Formaldehyde	30
19. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการเก็บ Platelets ไว้ในตู้เย็น ก่อนการทำ Flow Cytometry	31
20. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ Serum Dilution ที่ใช้ทำ ปฏิกิริยากับ 0.5% Thrombocyte Suspension	32
21. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) อุณหภูมิที่ใช้กับ Serum กับ 0.5% Platelet Suspension	32
22. เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการบ่ม Serum กับ 0.5% Platelet Suspension	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
23. ความคงตัวของน้ำยาตรวจ เมื่อใช้ตรวจ E-IAT ใน Serum ผู้ป่วย AIHA	37
24. ความคงตัวของน้ำยาตรวจ เมื่อใช้ตรวจ T-IAT ใน Serum ผู้ป่วย AITP	37
25. ผลการตรวจแสดงเป็น MFI ของ Flow Cytometry และ GA ของ Standard Tube Test ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test (E-DAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ	38
26. ผลการตรวจแสดงเป็น MFI ของ Flow Cytometry และ GA ของ Standard Tube Test ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test (E-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ	41
27. ผลการตรวจ Flow Cytometric T-DAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ	48
28. ผลการตรวจ Flow Cytometric T-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ	51

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. Flow Cytometric Histogram ของ Erythrocyte Antiglobulin Test	35
2. Flow Cytometric Histogram ของ Thrombocyte Antiglobulin Test	35
3. Grading of Agglutination ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test	45
4. Mean Fluorescent Intensity ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test	45
5. Grading of Agglutination ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test	46
6. Mean Fluorescent Intensity ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test	47
7. Mean Fluorescent Intensity ของ Thrombocyte Direct Antiglobulin Test	54
8. Mean Fluorescent Intensity ของ Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test	55

สารบัญย่อ

%	= percent
%CV	= percent coefficient of variation
$\pm$	= plus & minus
<	= lower than
>	= higher than
Ag-Ab	= antigen-antibody complex
agg	= agglutination
AHG	= anti-human immunoglobulin
AHG-FITC	= F(ab)' ₂ anti-human immunoglobulin conjugated fluorescein isothiocyanate
AIHA	= auto-immune hemolytic anemia
AITP	= auto-immune thrombocytopenia
BSA	= bovine serum albumin
BSA-PBS	= 1% bovine serum albumin in phosphate buffer saline
C3d	= Complement fraction 3 d
CCC	= Coomb's control cells
DAT	= direct antiglobulin test
E	= erythrocytes
E-DAT	= erythrocyte direct antiglobulin test
E-IAT	= erythrocyte indirect antiglobulin test

สารบัญย่อ (ต่อ)

F(ab)'2	= fraction of 2 antigen binding sides of immunoglobulin
Fc	= constant fraction of immunoglobulin
FC	= flow cytometry
FITC	= fluorescein isothiocyanate
FL2	= fluorescent detector 2 (~575 nm)
FL3	= fluorescent detector 3 (~625 nm)
FL4	= fluorescent detector 4 (~675 nm)
GA	= grading of agglutination
HDN	= hemolytic disease of the new born
HIV	= human immunodeficiency virus
IAT	= indirect antiglobulin test
IgG	= immunoglobulin G
IgM	= immunoglobulin M
LogFL1	= Logarithmic fluorescent detector 1
LogFSc	= Logarithmic forward scatter
LogSSc	= Logarithmic side scatter
MFI	= mean fluorescent intensity
Min	= minute
mm	= milli metre
N	= number

สารบัญย่อ (ต่อ)

NAD	= non-immune diseases
NAITP	= neonatal allo-immune thrombocytopenia
NITP	= non-immune thrombocytopenia
nm	= nano metre
$^{\circ}\text{C}$	= degree Celcius
P	= probabality value
PBS	= phosphate buffer saline
Plt	= platelets
RA	= roumatoid arthritis
RBC	= red blood cells
RT	= room temperature
S.D.	= standard diviation
Sec	= second
STT	= standard tube test
T	= thrombocytes
T-DAT	= thrombocyte direct antiglobulin test
T-IAT	= thrombocyte indirect antiglobulin test
μL	= micro litre

บทที่ 1

บทนำ

โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (auto-immune diseases) คือ โรคที่เกิดจากกลไกควบคุมการสร้างภูมิคุ้มกันสูญเสียไป ซึ่งอาจจะเป็นได้ทั้งภูมิคุ้มกันชนิดแอนติบอดี (antibody) และ/หรือภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองชนิดแอนติบอดีเท่านั้น ซึ่งแอนติบอดีโดยทั่วไป คือ สารโปรตีนที่จับอย่างจำเพาะกับสารหรือสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (antigen) ที่เข้ามากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แล้วจึงมีกระบวนการในการแตกสลายหรือทำลายโดยระบบคอมพลีเมนต์ (complements) หรือกระตุ้นให้มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (phagocytes) เข้ามาจับกินและย่อยสลายแอนติเจนดังกล่าว ซึ่งอาจจะเป็นได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย (bacteria), เชื้อรา (fungi), เชื้อไวรัส (virus), สารพิษ (toxin) หรือสารอื่นใดก็ตามที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่พอเหมาะ และเป็นสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่มี หรือมีแต่อยู่ในบริเวณที่ปกปิดมิดชิด ที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายยังไม่เคยสัมผัส โดยทั่วไปแล้วการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านสิ่งที่เป็นแอนติเจนของตนเองจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ในคนปกติ แต่ในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง กลับมีการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านแอนติเจนของตนเอง ที่เรียกว่าภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองหรือออโตแอนติบอดี (auto-antibody) ทำให้เกิดพยาธิสภาพตามมามากมาย แล้วแต่ว่าออโตแอนติบอดีที่สร้างขึ้นมานั้นจะไปจำเพาะกับเซลล์ (cells), เนื้อเยื่อ (tissue) หรืออวัยวะ (organ) ใด แล้วจึงมีกระบวนการทำลายเกิดขึ้นที่นั่น ความผิดปกติหรือโรคก็เกิดตามมา เนื่องจากการทำงานที่บกพร่องไปของเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ถูกทำลายนั้นๆ เช่น โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง 2 ชนิด ที่มีอาการอย่างเด่นชัดทางด้านโลหิตวิทยา เนื่องจากออโตแอนติบอดีไปทำลายองค์ประกอบที่สำคัญของเลือด คือ เม็ดเลือดแดง (erythrocytes [E], red blood cells; RBC) และเกล็ดเลือด (thrombocytes [T], blood platelets, platelets; Plt)

ได้แก่ โรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง และโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง ตามลำดับ

โรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง (auto-immune hemolytic anemia; AIHA) คือ โรคที่เกิดจากการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาทำลายเม็ดเลือดแดงของตนเอง ผู้ป่วยจะมีอาการสำคัญคือ ซีด (pallor), เหลือง (jaundice), อ่อนเพลีย และเหนื่อยง่าย เมื่อตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการมักจะพบ anemia เช่น hemoglobin, hematocrit และ red cell count ต่ำ นอกจากนี้ยังจะมีการตรวจพบ direct และ indirect antiglobulin (Coomb's) test ให้ผลบวก (positive) ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยโรค AIHA ที่สำคัญ หลักการของการตรวจ direct antiglobulin test (DAT) ก็คือ การตรวจหาว่ามีแอนติบอดีเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงอยู่แล้วตั้งแต่อยู่ในร่างกายของผู้ป่วยหรือไม่ วิธีการตรวจโดยย่อคือ นำเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) เกาะอยู่แล้วแต่ยังไม่มีการเกาะกลุ่ม เนื่องจากแอนติบอดีนั้นเป็นชนิด immunoglobulin G (IgG) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กเกินไปไม่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) ได้ มาล้างเอาน้ำเหลืองออกให้หมดด้วยน้ำเกลือปกติ (normal saline solution) แล้วให้ทำปฏิกิริยากับน้ำยาแอนติโกลบูลิน (polyspecific antiglobulin reagent) ซึ่งเป็นแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ที่จะเข้าไปเกาะติดกับแอนติบอดีตัวแรกบนผิวเม็ดเลือดแดงอีกชั้นหนึ่ง แล้วทำให้เกิดการเกาะกลุ่มให้เห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ ให้ผลบวก การตรวจ indirect antiglobulin test (IAT) คือ การตรวจหาว่าในน้ำเหลือง (serum หรือ plasma) ของผู้ป่วยจะมีแอนติบอดีอิสระ (free หรือ unbound antibody) ที่สามารถจะไปจับกับเม็ดเลือดแดงได้หรือไม่ วิธีการโดยย่อคือ นำน้ำเหลืองของผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของคนปกติ แล้วล้างเอาน้ำเหลืองออกให้หมดด้วยน้ำเกลือปกติ แล้วให้ทำปฏิกิริยากับน้ำยาแอนติโกลบูลิน ถ้ามีแอนติบอดีที่สามารถจับกับเม็ดเลือดแดงได้ ก็จะให้ผลบวก การตรวจ DAT และ IAT มีความสำคัญมากในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาโรค AIHA แต่ข้อเสียก็คือ มีความไวต่ำ (low sensitivity) การอ่านผลเป็นแบบที่จะต้อง

อาศัยการดูด้วยตา ซึ่งขึ้นอยู่กับความรู้ ความชำนาญ และประสบการณ์ของผู้ทำการตรวจอย่างมาก (subjective) ทำให้มาตรฐานและคุณภาพการตรวจแตกต่างกันออกไปในแต่ละห้องปฏิบัติการ จึงทำให้การตรวจดังกล่าวไม่ได้รับความสนใจสั่งตรวจจากแพทย์เท่าที่ควร ทั้งที่เป็นการตรวจที่มีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษาโรค AIHA อย่างมากก็ตาม

โรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง (auto-immune thrombocytopenia; AITP) คือ โรคที่เกิดจากการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาทำลายเกล็ดเลือด (blood platelets; Plt) ของตนเอง ผู้ป่วยจะมีอาการสำคัญคือ มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง (petechiae), มีเลือดกำเดาไหล และอาจมีเลือดออกในอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต และ สมอง เป็นต้น เมื่อตรวจเลือดจะพบว่ามีเกล็ดเลือดต่ำมาก นอกจากนี้ยังจะมีการตรวจพบ DAT และ IAT ของเกล็ดเลือดให้ผลบวก หลักการตรวจก็คล้ายกับการตรวจ DAT และ IAT ของเม็ดเลือดแดงในโรค AIHA ดังกล่าวข้างต้น แต่ต้องใช้เกล็ดเลือดแทนเม็ดเลือดแดง ดังนั้นปัญหาต่างๆ ในเรื่องความไวต่ำและเป็นแบบ subjective จึงยังคงมีอยู่เช่นเดียวกัน ทำให้การตรวจดังกล่าวไม่ได้รับความสนใจสั่งตรวจจากแพทย์เท่าที่ควร ทั้งที่เป็นการตรวจที่มีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาโรค AITP อย่างมากก็ตาม

Flow cytometry เป็นเทคนิคการตรวจนับและวัดคุณสมบัติจำเพาะของเซลล์ที่กำลังไหลเป็นแถวเรียงเดี่ยวผ่านลำแสงเลเซอร์ โดยที่ ขนาด (size) และ องค์ประกอบภายใน (granularity) สามารถตรวจได้โดยตรง สำหรับคุณสมบัติจำเพาะอื่น ๆ เช่น surface และ intracellular markers จะต้องทำการย้อมสี fluorescence หรือ immunofluorescence ก่อนจึงจะทำการตรวจได้ การใช้ flow cytometry มีข้อดีเหนือกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ คือ สามารถตรวจเซลล์จำนวนมากได้ภายในเวลารวดเร็ว เช่น 50,000 เซลล์ ในเวลาเพียง 2-3 นาที ในขณะที่การใช้กล้องจุลทรรศน์นับ 1000 เซลล์ อาจต้องใช้เวลานานถึง 10 นาที ทำให้ผู้นับเมื่อยล้าอันอาจนำไปสู่การนับที่ผิดพลาดได้ (subjective) ในขณะที่ flow cytometry นั้นนับด้วยเครื่องที่ให้ผลแน่นอน น่าเชื่อถือมากกว่า (objective) ดังนั้น flow cytometry จึงได้รับความนิยมมากขึ้น

ในการใช้ตรวจนับเซลล์ โดยเฉพาะในทางโลหิตวิทยา เช่น การนับประชากรย่อยของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes ในผู้ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) และ การนับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (leukemia) เป็นต้น

Flow cytometric antiglobulin test สำหรับการตรวจวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาโรค auto-immune hemolytic anemia (AIHA) วิธี flow cytometry ถูกนำมาใช้ตรวจหา immunoglobulin G (IgG) และ subclasses ของ IgG บนผิว RBC เพื่อการวินิจฉัยแยกโรค AIHA และ hemolytic disease of the new born (HDN) ซึ่งเชื่อว่าเป็นวิธีที่ดีกว่าและน่าจะเข้ามาแทนวิธีดั้งเดิม ที่ดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) โดยการตรวจดูด้วยตาเปล่าและ/หรือใช้กล้องจุลทรรศน์ (Lynen 1994) นอกจากนี้วิธี flow cytometry ยังสามารถใช้ในการตรวจหากลไกการเกิดโรค AIHA โดยพบว่ากลไกควบคุมภูมิคุ้มกันต้านเซลล์ของผู้ป่วยโรค AIHA ผิดปกติ โดยเฉพาะในช่วงที่มีอาการของโรคกำเริบ (Iwase 1995) และได้มีการเปรียบเทียบวิธี flow cytometry กับวิธี hemagglutination ในการตรวจหา antigens และ antibodies ของเม็ดเลือดแดง พบว่าวิธี flow cytometric antiglobulin สามารถวิเคราะห์ประชากรย่อยของเซลล์ได้ นับเซลล์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ทำการตรวจได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ผลการตรวจไม่ขึ้นอยู่กับการรู้และความชำนาญของผู้ตรวจเพียงอย่างเดียว ทำให้มีความไว (sensitivity) และ ความน่าเชื่อถือ (reliability) ดีกว่าวิธีดั้งเดิม (Fischer 1995) ซึ่งมีการยืนยันประสิทธิภาพที่ดีกว่าของวิธี flow cytometry อีกหลายครั้งในผู้ป่วย AIHA และ auto-immune diseases อื่นๆ (Wang 2001, Zeiler 2001, Cabiedes 2002, Gutting 2002 & Shnaider 2002) แต่ก็ยังไม่มีผู้นำ flow cytometric antiglobulin test มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและติดตามการรักษาผู้ป่วย AIHA ในประเทศไทยอย่างจริงจัง คณะผู้วิจัยพัฒนาวิธีการตรวจและชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูป สำหรับทั้ง direct และ indirect antiglobulin test ของเม็ดเลือดแดงที่ใช้ flow cytometry ในการตรวจนับ ขึ้นมาใช้เองภายในประเทศ และมุ่งหวังว่าจะ

ผลิตจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศต่อไป อันจะเป็นการประหยัดงบประมาณของประเทศ และอาจจะส่งเป็นสินค้าออกนำเงินตราเข้าประเทศได้อีกทางหนึ่ง

Flow cytometric antiglobulin test สำหรับการตรวจวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาโรค auto-immune thrombocytopenia (AITP) วิธี flow cytometry ถูกนำมาใช้ตรวจหา antiplatelet antibodies และพบว่าสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยแยกโรค AITP ออกจาก non-immune thrombocytopenia (NITP) ได้เป็นอย่างดี (Rosenfeld 1987) และวิธี flow cytometry ยังมีข้อดีเหนือกว่าวิธีอื่นๆ ในการตรวจหา antiplatelet antibodies ก็คือสามารถแยกประชากรย่อยของเกล็ดเลือดได้ ทำให้ทราบว่าหากมี auto-antibody เกาะติดกับเกล็ดเลือดนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของเกล็ดเลือด หมายความว่าไม่ว่าเกล็ดเลือดจะมีขนาดใหญ่หรือเล็กก็มีโอกาสที่จะถูกจับด้วยแอนติบอดีเท่าเทียมกัน (Holme 1988) หลังจากนั้นวิธี flow cytometry ทั้งชนิด direct และ indirect antiglobulin test ก็ถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค AITP และ NAITP (neonatal allo-immune thrombocytopenia) กันอย่างกว้างขวางทั้งแบบคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative measurment) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative measurement) (Heim 1988, Christopoulos 1993, Hagenstrapm 2000, Romeo-Guzmain 2000, Tomer 2002 & Fabris 2002) แต่ส่วนใหญ่จะเป็นงานวิจัย และยังไม่ได้มีการนำมาใช้เป็นการตรวจในงานประจำวันแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี flow cytometry สำหรับตรวจนับ reticulated platelets หรือเกล็ดเลือดตัวอ่อน ซึ่งสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดการตอบสนองต่อการรักษาของโรค AITP และโรคอื่นๆ ที่มีอาการ thrombocytopenia ร่วมด้วย ได้เป็นอย่างดี (Rinder 1993) แต่ก็ยังไม่มีให้นำ flow cytometric antiglobulin test มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาผู้ป่วย AITP ในประเทศไทยอย่างจริงจัง คณะผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีการตรวจและชุดน้ำยาตรวจสำเร็จรูป สำหรับทั้ง direct และ indirect antiglobulin test ของเกล็ดเลือดที่ใช้ flow cytometry ในการตรวจนับ ขึ้นมาใช้เองภายในประเทศ และมุ่งหวังว่าจะ

ผลิตจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศต่อไป อันจะเป็นการประหยัดงบประมาณของประเทศ และอาจจะส่งเป็นสินค้าออกนำเงินตราเข้าประเทศได้อีกทางหนึ่ง

คณะผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้วิธีโฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) ซึ่งมีอยู่แล้วในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยโดยทั่วไป มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและติดตามการรักษาโรค AIHA และ AITP ดังกล่าว โดยการพัฒนาวิธีการที่เรียกว่า โฟลไซโทเมทริกแอนติโกลบูลินเทส (flow cytometric antiglobulin test) เพื่อการตรวจนับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่ (DAT ของเม็ดเลือดแดงและของเกล็ดเลือดตามลำดับ; E-DAT และ T-DAT) และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้ (IAT ของ เม็ดเลือดแดงและของเกล็ดเลือดตามลำดับ; E-IAT และ T-IAT) ซึ่งมีหลักการโดยย่อดังต่อไปนี้ คือ ในวิธี DAT การล้าง RBC (E) หรือ Plt (T) ยังคงเดิม แต่การทำปฏิกิริยากับ polyspecific antiglobulin reagent จะเปลี่ยนไปใช้ชนิดที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง ได้แก่ F(ab)'₂ anti-human immunoglobulin conjugated fluorescein isothiocyanate (AHG-FITC) (fluorescein isothiocyanate, FITC) หรือ ในวิธี IAT ปฏิกริยาระหว่างน้ำเหลืองกับ RBC หรือ Plt ยังคงเดิม การล้างยังคงเดิม และเช่นเดียวกัน คือ เปลี่ยนมาใช้ FITC-conjugated antiglobulin แทน antiglobulin ธรรมดา จากนั้นจึงนำไปทำการตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ในจำนวน 50,000 เซลล์ ซึ่งจะสามารถเพิ่ม sensitivity ได้เป็นอย่างดี และเป็นวิธีการตรวจวัดที่เป็นแบบ objective ทำให้ผลการตรวจที่ได้มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากขึ้นกว่าวิธีดั้งเดิมดังกล่าว นอกจากนี้การตรวจที่จำเพาะลงไปว่าแอนติบอดีเป็นชนิด IgG, IgM หรือ C3d ก็สามารถทำได้โดยเปลี่ยนจากน้ำยา polyspecific antiglobulin reagent ไปเป็น monospecific antiglobulin reagent ที่จำเพาะต่อ IgG หรือ IgM หรือ C3d แทน ซึ่งนิยมทำในกรณีที่ให้ผลบวกจาก polyspecific antiglobulin reagent มาแล้ว เนื่องจากลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากแอนติบอดีต่างชนิดกันไม่เหมือนกัน รวมทั้งการรักษาที่แตกต่างกันด้วย

ปัญหา low sensitivity และ subjectivity ของ วิธี DAT และ IAT ของทั้ง RBC และ Plt ในวิธีดั้งเดิม ทำให้ผลการตรวจไม่น่าเชื่อถือ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธี flow cytometry ที่มี high sensitivity และ objectivity มาใช้ในการตรวจ DAT และ IAT ของทั้ง RBC และ Plt ทดแทนวิธีดั้งเดิม เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อ ผู้ป่วย AIHA และ AITP, แพทย์ผู้ทำการรักษา และนักเทคนิคการแพทย์ผู้ทำการตรวจ ต่อไปในอนาคต

โรค AIHA และ AITP ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในผู้ป่วยชาวไทย การพัฒนาวิธีการตรวจ และนำยาตรวจดังกล่าวช่วยให้การตรวจวินิจฉัยแยกโรคและติดตามการรักษาทำได้อย่างมีคุณภาพและน่าเชื่อถือมากขึ้น อันจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นได้ในอนาคต เมื่อวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ น้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นมานี้น่าจะมีโอกาสในการผลิตในเชิงพาณิชย์ และมุ่งหวังว่าจะผลิตจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศ เป็นการประหยัดงบประมาณได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อพัฒนาวิธีการและชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติบอดีเกาะติดอยู่โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี (E-DAT)
- 2) เพื่อพัฒนาวิธีการและชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะติดกับเม็ดเลือดแดงได้โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี (E-IAT)
- 3) เพื่อพัฒนาวิธีการและชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจนับเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะติดอยู่โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี (T-DAT)
- 4) เพื่อพัฒนาวิธีการและชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะติดกับเกล็ดเลือดได้โดยวิธีโฟลไซโทเมทรี (T-IAT)
- 5) เพื่อพัฒนาชุดน้ำยาตรวจชุดเดียวที่ตรวจหาตัวแปล (parameters) ดังกล่าว ได้ทั้ง 4 ชนิด
- 6) เพื่อนำวิธีการตรวจและชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นนี้ มาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค AIHA และ AITP เปรียบเทียบกับโรคอื่นๆ ที่คล้ายคลึงกัน และกับคนปกติ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรค AIHA, AITP และโรคอื่นๆ ขอจากผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษา ใน โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เช่น หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ หน่วยเก็บรักษาและบริการ งานธนาคารเลือด หน่วยปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา งานปฏิบัติการกลางและชั้นสูตรโรค เลือดคนปกติขอจาก หน่วยจัดหาและบริการ งานธนาคารเลือด หรือจากนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ที่ฝึกปฏิบัติการเจาะเลือด ในระหว่างการเรียนวิชาโลหิตวิทยา เป็นต้น โดยการลงนามในใบยินยอม (consent form) เป็นผู้ถูกวิจัย ในกรณีที่ผู้ป่วยอายุระหว่าง 15-18 ปี จะต้องได้รับความยินยอมจากผู้ปกครอง และจะไม่ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่อายุต่ำกว่า 15 ปี จำนวนตัวอย่างวิจัยมี 5 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วย AIHA (n = 50) กลุ่มผู้ป่วย AITP (n = 50) กลุ่มผู้ป่วย rheumatoid arthritis (RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วย non-immune diseases (NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) โดยเก็บเลือดรายละเอียดประมาณ 3-5 มิลลิลิตร เพื่อใช้หาประสิทธิภาพในการวินิจฉัยแยกโรคของค่าการตรวจ (parameters) ทั้ง 4 ดังกล่าว โดยโรค AIHA ตรวจหาค่า E-DAT และ E-IAT และโรค AITP ตรวจหาค่า T-DAT และ T-IAT

วัสดุ สารเคมี และน้ำยาตรวจ

Anti-Hu-C3d-FITC

Anti-Hu-IgG-FITC

Anti-Hu-IgM-FITC

Anti-Hu-Igs (polyspecific)

Anti-Rh(D) serum

Blue tips

BSA powder

Cellpack

Cell clean

Coomb's control cells

Formaldehyde

Platelet concentrate (group O)

Sheath fluid

Screening O RBC

F(ab)'₂ goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC)

Flow plastic tubes

Glutaraldehyde

Glyoxal

Iso-Cont-FITC

PBS tablets

Stromatolyser

White tips

Yellow tips

เครื่องมือ

Balance, Model AR2130, Ohaus, USA.

Blood bank centrifuge, Model Centra-B Plus, Thermo, USA.

Centrifuge, Model H-103N, Kokusan, Japan.

Computer, Model IT Service Station, Belta, China.

Flow cytometer, Model Epics XL, Beckman Coulter, USA.

Freezer, Model SF C992 NG, Sanyo, Thailand.

Hot Plate Stirrer, Model HTS 1003, LMS Company, Japan.

Light microscope, Model CX31 RBSFA, Olumpus, Japan.

pH meter, Model pH 210, Hanna Instruments, USA.

Refrigerator, Model RT41MA, Samsung, Thailand.

Waterbath, Model BM 403 (30L), Nuve, Turkey.

การตรวจหา **Direct Antiglobulin Test (DAT)** ด้วย **Standard Tube Test (STT)**

เติม 50 μ L packed RBC ของผู้ป่วย ลงใน 950 μ L PBS ผสมให้เข้ากันดี จะได้ 5% RBC suspension ใน PBS ใส่ 25 μ L ของ 5% RBC suspension ลงในหลอดแก้วทกลอง ขนาด 10x75 mm. ล้าง RBC ดังกล่าว ด้วย PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatant ทั้ง 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย ชັบ PBS ออกให้มากที่สุดด้วยกระดาดชັบ ได้เป็น RBC button เติม 100 μ L ของ polyspecific anti-human globulin serum AHG ผสมให้เข้ากันดี แล้วปั่นอ่านผล 15 วินาที ปั่นที่กผล agglutination (agg) ถ้าไม่พบ agg ให้เติม 50 μ L ของ 5% Coomb's control cells (CCC) ลงไปผสมให้เข้ากันดี ปั่นอ่านผล 15 วินาที อ่านผล agg ถ้าพบ agg ให้แปลผลเป็น negative ถ้าไม่พบ agg แสดงว่า AHG เสื่อมสภาพ ต้องทำการทดสอบใหม่ โดยใช้ AHG ขวดใหม่ ที่ยังมีสภาพดี

หมายเหตุ สำหรับ RBC control ใช้ RBC group O Rh positive ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ anti-Rh(D) serum นาน 30 นาที ใน 37 °C เป็น positive control RBC และใช้ normal RBC เป็น negative control RBC

การตรวจหา Indirect Antiglobulin Test (IAT) ด้วย Standard Tube Test (STT)

เตรียม 5% RBC suspension ใน phosphate buffer saline (PBS) ทำโดย ล้าง RBC group O ด้วย PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatant ทิ้ง 3 ครั้ง ได้เป็น wash RBC เติม 50 μL wash RBC ลงใน 950 μL PBS ผสมให้เข้ากันดี จะได้ 5% RBC suspension ใน PBS

การตรวจ indirect antiglobulin test (IAT) ด้วย standard tube test ทำโดย เติม 50 μL tested serum ลงใน glass test tube ขนาด 12x75 mm แล้วเติม 25 μL 5% RBC suspension ใน PBS ลงไป ผสมให้เข้ากันดี incubate 5 นาที ใน room temperature (RT) เมื่อครบเวลาแล้ว ปั่นอ่านผล 15 วินาที บันทึกผล aggregation (agg) ขั้นที่ 1 (RT) จากนั้น incubate 30 นาที ใน 37 °C เมื่อครบเวลาแล้ว ปั่นอ่านผล 15 วินาที บันทึกผล agg ขั้นที่ 2 (37 °C) จากนั้น ล้าง RBC ด้วย PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatant ทิ้ง 3 ครั้ง ครั้งสุดท้าย ชັบ PBS ออกให้มากที่สุดด้วยกระดาษซับ ได้เป็น RBC button เติม 100 μL polyspecific anti-human globulin serum AHG ผสมให้เข้ากันดี แล้วปั่นอ่านผล 15 วินาที บันทึกผล agg ขั้นที่ 3 (AGT) ถ้าไม่พบ agg ให้เติม 50 μL 5% CCC ลงไปผสมให้เข้ากันดี ปั่นอ่านผล 15 วินาที อ่านผล agg ถ้าพบ agg ให้แปลผลเป็น negative ถ้าไม่พบ agg แสดงว่า AHG เสื่อมสภาพ ต้องทำการทดสอบใหม่ โดยใช้ AHG ขวดใหม่ ที่ยังมีสภาพดี

หมายเหตุ การอ่านผลขั้นที่ 1 ขั้นที่ 2 และขั้นที่ 3 ถ้าพบ agg ไม่ว่าขั้นตอนใด ให้แปลผลว่า positive แต่ในขั้นสุดท้าย CCC จะต้องพบ agg จึงจะแปลผลว่า negative ได้ สำหรับ serum control ใช้ anti-Rh(D) serum เป็น positive control serum และใช้ normal serum เป็น negative control serum

การพัฒนาวิธี Flow Cytometric Erythrocyte Direct Antiglobulin Test (E-DAT)

1. ทดสอบหาจำนวนครั้งของการล้างเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบการล้าง 1, 2 & 3 ครั้ง ด้วย 0.1% BSA-PBS
2. ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเม็ดเลือดแดงหลังจากการล้างแล้ว โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % RBC ใน 0.1% BSA-PBS
3. ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiglobulin reagent ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นที่ dilution 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS เปรียบเทียบปริมาตรที่ใช้ที่ 25, 50, 75, & 100 μL รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 & 37 $^{\circ}\text{C}$ และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที
4. ทดสอบหาความเข้มข้นของ formaldehyde ที่เหมาะสมในการตรึง RBC เก็บไว้ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ได้ทันที โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % ของ formaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS
5. ทดสอบความคงตัวของ RBC ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้ว ที่เก็บไว้ในตู้เย็น (refrigerator) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5 & 7 วัน

การพัฒนาวิธี Flow Cytometric Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test (E-IAT)

การเตรียม Erythrocyte (RBC) suspension สำหรับ E-IAT โดยซื้อ screening group O RBC suspension จากสหภาพชาติไทย นำมาเตรียม 0.5% fix-washed RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS เริ่มจากล้าง RBC ด้วย PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatant ที่ทิ้ง 3 ครั้ง ได้เป็น wash RBC ผสมกับ 0.05% glutaraldehyde ใน 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (RT) นาน 30 นาที ล้าง RBC ด้วย 0.1% BSA-PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatant ที่ทิ้ง 3 ครั้ง แล้วเติม 5 μL fix-wash-packed RBC ลงใน 950 μL 0.1% BSA-PBS จะได้ 0.5% fix-washed RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS

สำหรับใช้เป็น target erythrocytes เพื่อให้ antibody ใน serum สามารถมาจับได้ ก่อนการทำ erythrocyte indirect antiglobulin test ต่อไป

- 1 ทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.5% fix-washed RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS ปริมาตร 25 μ L กับ serum ผู้ป่วย ปริมาตร 50 μ L ที่ dilution: Undilute, 1:10, 1:100 & 1:1000 ด้วย 0.1% BSA-PBS รวมทั้งเปรียบเทียบ อุณหภูมิที่ 4, 25 (RT) & 37 °C และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที
- 2 ขั้นตอนต่อไป เหมือนกับ E-DAT ข้อ 1 – 5

การพัฒนาวิธี Flow Cytometric Thrombocyte Direct Antiglobulin Test (T-DAT)

- 1 ทดสอบหาจำนวนครั้งของการล้างเกล็ดเลือดที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบการล้าง 1, 2 & 3 ครั้ง ด้วย 0.1% BSA-PBS
- 2 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเกล็ดเลือดหลังจากการล้างแล้ว โดยเปรียบเทียบ ความเข้มข้นที่ 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % Plt ใน 0.1% BSA-PBS
- 3 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiglobulin reagent ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการ ทำปฏิกิริยากับเกล็ดเลือดที่ล้างแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นที่ dilution 1:10 ด้วย 0.1% BSA-PBS เปรียบเทียบปริมาตรที่ใช้ที่ 25, 50, 75, & 100 μ L รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 & 37 °C และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที
- 4 ทดสอบหาความเข้มข้นของ formaldehyde ที่เหมาะสมในการตรึง Plt เก็บไว้ในกรณีที่ไม่ สามารถตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ได้ทันที โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % ของ formaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS
- 5 ทดสอบความคงตัวของ Plt ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้ว ที่เก็บไว้ในตู้เย็น (refrigerator) ได้เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5 & 7 วัน

การพัฒนาวิธี Flow Cytometric Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test (T-IAT)

การเตรียม Thrombocyte (Plt) suspension สำหรับ T-IAT โดยใช้ group O expired platelet concentrate จากสภากาชาดไทย นำมาเตรียม fix-washed Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS เริ่มจากปั่น platelet concentrate ให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatantทิ้ง ทำ 3 ครั้ง ได้เป็น wash Plt ผสมกับ 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (RT) นาน 30 นาที ล้าง Plt ด้วย 0.1% BSA-PBS โดยปั่นให้ตกตะกอน แล้วดูด supernatantทิ้ง ทำ 3 ครั้ง แล้วเติม 5 μ L fix-wash-packed Plt ลงใน 950 μ L 0.1% BSA-PBS จะได้ 0.5% fix-washed Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS สำหรับใช้เป็น target thrombocytes เพื่อให้ antibody ใน serum สามารถมาจับได้ ก่อนการทำ thrombocyte indirect antiglobulin test ต่อไป

- 1 ทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.5% fix-washed Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS ปริมาตร 25 μ L กับ serum ผู้ป่วย ปริมาตร 50 μ L ที่ dilution: Undilute, 1:10, 1:100 & 1:1000 ใน 0.1% BSA-PBS รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 (RT) & 37 °C และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที
- 2 ขั้นตอนต่อไป เหมือนกับ T-DAT ข้อ 1 - 5

สรุปวิธีการตรวจ Direct Antiglobulin Test (DAT) ด้วย Flow Cytometry (FC)

Erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT)

ใช้ 5% RBC suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μ L ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed RBC suspension โดยการเติม 250 μ L ของ 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ใช้ 75 μ L ของ 0.5 % washed RBC suspension ผสมกับ 75 μ L ของ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) ที่ dilute 1:10 ใน

0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นเติม จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งเครื่องให้นับ 50,000 RBC ที่ low flow rate หรือให้มี อัตราการไหลของ RBC ผ่านลำแสง laser ไม่เกิน 1,000 RBC ต่อ second โดยใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ RBC ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

Thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT)

ใช้ 5% platelet (Plt) suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μL ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed Plt suspension โดยการเติม 250 μL ของ 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ใช้ 75 μL ของ 0.5 % washed Plt suspension ผสมกับ 75 μL ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งเครื่องให้นับ 50,000 Plt ที่ low flow rate หรือให้มี อัตราการไหลของ RBC ผ่านลำแสง laser ไม่เกิน 1,000 Plt ต่อ second โดยใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ Plt ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

สรุปวิธีการตรวจ Indirect Antiglobulin Test (IAT) ด้วย Flow Cytometry (FC)

Erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT)

ใช้ 5% Screening group O RBC suspension ที่ได้มาจากสภากาชาดไทย นำมาเตรียมเป็น glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน

แล้วจึงใช้ 25 μ L ของ glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับ 75 μ L ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม 500 μ L ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้นับ 50,000 RBC ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ serum ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

Thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT)

ใช้ group O expired platelet concentrate จากสภากาชาดไทย นำมาเตรียมเป็น 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde fix-washed 0.5 % Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน แล้วจึงใช้ 25 μ L ของ Plt suspension ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับ 75 μ L ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม 500 μ L ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้นับ 50,000 Plt ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ serum ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

การพัฒนาชุดน้ำยาตรวจ Flow Cytometric Antiglobulin Test

จากสภาวะที่เหมาะสมแล้วที่ได้ นำมาเตรียมชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ที่สามารถตรวจได้ทั้ง 4 parameters (E-DAT, E-IAT, T-DAT & T-IAT) ในน้ำยาชุดเดียว ซึ่งประกอบด้วย

1. Diluent ได้แก่ 0.1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (0.1% BSA-PBS)
2. Erythrocyte fixative solution ได้แก่ 0.05% glutaraldehyde ใน 0.1%BSA-PBS
3. Thrombocyte fixative solution ได้แก่ 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS
4. Secondary antibody ได้แก่ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC)
5. Fix-to-flow solution ได้แก่ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS

การศึกษาความคงตัวของชุดน้ำยาตรวจ Flow Cytometric Antiglobulin Test

ศึกษาความคงตัวของชุดน้ำยาที่เตรียมได้ ที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยทำการตรวจทั้ง E-IAT และ T-IAT ในตัวอย่าง serum ผู้ป่วย AIHA และ AITP ตามลำดับ ที่แยกเป็น aliquats เก็บไว้ใน freezer -20 °C แล้วนำออกมาละลายทีละ 1 aliquat เพื่อทำการตรวจ เดือนละครั้ง รวม 6 เดือน หรือ 6 ครั้ง

เปรียบเทียบค่า Flow Cytometric E-DAT และ E-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ

ผู้ป่วยโรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง (AIHA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (rhumatoid arthritis, RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases,

NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ที่ได้มาจาก โรงพยาบาลมหาราชนคร เชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม 2547 ถึง เดือน มิถุนายน 2548

เปรียบเทียบค่า Flow Cytometric T-DAT และ T-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ

กลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง (AITP, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (rhumatoid arthritis, RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases, NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ที่ได้มาจาก โรงพยาบาลมหาราชนคร เชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม 2547 ถึง เดือน มิถุนายน 2548 เช่นกัน

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการพัฒนาวิธี Flow Cytometric Erythrocyte Direct Antiglobulin Test (E-DAT)

1. ผลการทดสอบหาจำนวนครั้งของการล้างเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบการล้าง 1, 2 & 3 ครั้ง พบว่าการล้าง 3 ครั้ง ให้ค่า different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของการล้าง Erythrocytes

MFI \ Wash	1 Time	2 Times	3 Times
MFI of AIHA RBC	0.789	1.186	1.680
MFI of Normal RBC	0.670	0.689	0.677
Different MFI	0.119	0.497	1.003

พบว่าการล้าง 3 ครั้ง ให้ค่า different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

2. ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเม็ดเลือดแดงหลังจากการล้างแล้ว โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % RBC ใน 0.1% BSA-PBS พบว่าการใช้ 0.5 % RBC suspension ใช้เวลานับเหมาะสมที่สุด ไม่เร็วหรือช้าเกินไป และให้ค่า different MFI เหมาะสมที่สุด จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 2 – 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบระยะเวลาการนับครบ 50,000 ของ % RBC Suspension

% RBC Suspension →	0.125 %	0.25 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %
Time of Flow Cytometry (Sec) ↓					
AIHA RBC	> 300	252	157	93	35
Normal RBC	> 300	225	142	90	33

พบว่าการใช้ 0.5 % RBC suspension ใช้เวลาเหมาะสมที่สุด ไม่เร็วหรือช้าเกินไป จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ % RBC Suspension

% RBC Suspension →	0.125 %	0.25 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %
MFI ↓					
MFI of AIHA RBC	1.785	1.762	1.689	1.457	1.261
MFI of Normal RBC	0.699	0.687	0.655	0.658	0.649
Different MFI	1.086	1.075	1.034	0.796	0.612

พบว่าการใช้ 0.5 % RBC suspension ให้ค่า different MFI เหมาะสมที่สุด โดยมีระยะเวลานับเหมาะสมด้วย จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

- ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiglobulin reagent ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นที่ dilution 1:10 เปรียบเทียบปริมาตรที่ใช้ที่ 25, 50, 75, & 100 μL รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 & 37 $^{\circ}\text{C}$ และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที พบว่า การใช้ AHG-FITC ที่ปริมาตร 75 μL บ่มที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที มี different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 4 – 6

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของปริมาณ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate (AHG-FITC) ที่ dilute 1:10

Volume of AHG-FITC (μL) →	25	50	75	100
MFI ↓				
MFI of AIHA RBC	1.026	1.239	1.687	1.726
MFI of Normal RBC	0.636	0.678	0.682	0.699
Different MFI	0.390	0.561	1.005	1.027

พบว่าการใช้ AHG-FITC ที่ปริมาณ 75 μL มี different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ลดการทดลอง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของอุณหภูมิที่ใช้ร่วมกับ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate

Incubation Temperature ($^{\circ}\text{C}$) →	4	25	37
MFI ↓			
MFI of AIHA RBC	1.012	1.682	1.679
MFI of Normal RBC	0.642	0.686	0.690
Different MFI	0.370	0.996	0.989

พบว่าการร่วมกับ AHG-FITC ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ มี different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ลดการทดลอง

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาที่ใช้บ่มกับ

Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate

Incubation Time (Min) →	20	30	40	50	60
MFI ↓					
MFI of AIHA RBC	1.476	1.689	1.678	1.692	1.702
MFI of Normal RBC	0.645	0.670	0.669	0.675	0.677
Different MFI	0.831	1.019	1.009	1.017	1.025

พบว่าระยะเวลาที่ใช้บ่มกับ AHG-FITC ที่ 30 นาที มี different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

- ทดสอบหาความเข้มข้นของ formaldehyde ที่เหมาะสมในการตรึง RBC เก็บไว้ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ได้ทันที โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % ของ formaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS พบว่าการใช้ formaldehyde ที่ทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อ different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ที่ 1% ตลอดการทดลอง เนื่องจากเตรียมง่าย ดังแสดงใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของความเข้มข้น (%) ของ

Formaldehyde

Concentration of Formaldehyde (%) →	0.25	0.5	1.0	2.0
MFI ↓				
MFI of AIHA RBC	1.676	1.679	1.678	1.681
MFI of Normal RBC	0.666	0.668	0.679	0.687
Different MFI	1.016	1.011	0.999	0.994

พบว่าการใช้ formaldehyde ที่ทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อ different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ที่ 1% ตลอดการทดลอง เนื่องจากเตรียมง่าย

5. ทดสอบความคงตัวของ RBC ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้ว ที่เก็บไว้ในตู้เย็น (refrigerator) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5 & 7 วัน พบว่าการเก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน ในตู้เย็น ไม่มีผลต่อ Different MFI จึงสามารถอ่านผลด้วย flow cytometry ได้ภายใน 7 วัน ดังแสดงใน ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการเก็บ

RBC ไว้ในตู้เย็น ก่อนการทำ Flow Cytometry

Time of Storage (Day) →	0	1	3	5	7
MFI ↓					
MFI of AIHA RBC	1.686	1.689	1.679	1.685	1.682
MFI of Normal RBC	0.645	0.658	0.671	0.675	0.682
Different MFI	1.041	1.031	1.008	1.010	1.000

พบว่า การเก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน ในตู้เย็น ไม่มีผลต่อ Different MFI จึงสามารถอ่านผลด้วย flow cytometry ได้ภายใน 7 วัน

ผลการพัฒนาวิธี Flow Cytometric Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test (E-IAT)

- ทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.5% fix-washed RBC suspension ใน PBS ปริมาตร 25 μL กับ serum ผู้ป่วย ปริมาตร 50 μL ที่ dilution: Undilute, 1:10, 1:100 & 1:1000 รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 (RT) & 37 $^{\circ}\text{C}$ และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที พบว่าการใช้ undiluted serum ที่ปริมาตร 50 μL ต่อ 5% RBC suspension ปริมาตร 25 μL บ่มที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ นาน 30 ถึง 60 นาที มี Different MFI สูงไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ 30 นาที ตลอดจนทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 9 – 11

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ Serum Dilution ที่ใช้ทำ

ปฏิกิริยากับ 0.5% Erythrocyte Suspension

50 μL of Diluted Serum at (%) → MFI ↓	Undilute	1:10	1:100	1:1000
MFI of AIHA Serum	1.784	1.432	1.027	0.687
MFI of Normal Serum	0.679	0.675	0.663	0.654
Different MFI	1.105	0.757	0.364	0.033

พบว่าการใช้ undiluted serum ที่ปริมาตร 50 μL ต่อ 5% RBC suspension ปริมาตร 25 μL

ให้ค่า different MFI สูงที่สุด จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) อุณหภูมิที่ใช้บ่ม Serum กับ

0.5% Red Blood Cell Suspension

Temperature (°C) →	4	25	37
MFI ↓			
MFI of AIHA Serum	1.084	1.532	1.728
MFI of Normal Serum	0.676	0.669	0.673
Different MFI	0.408	0.863	1.055

พบว่าการใช้อุณหภูมิ 37 °C บ่ม serum กับ RBC ให้ค่า different MFI สูงที่สุด จึงเลือกใช้

ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการบ่ม

Serum กับ 0.5% Red Blood Cell Suspension

Time of Incubation (Min) →	20	30	40	50	60
MFI ↓					
MFI of AIHA Serum	1.488	1.679	1.692	1.688	1.687
MFI of Normal Serum	0.632	0.645	0.651	0.662	0.677
Different MFI	0.856	1.034	1.041	1.026	1.010

พบว่าระยะเวลาในการบ่ม ตั้งแต่ 30 ถึง 60 นาที มี Different MFI สูงไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้

30 นาที ตลอดการทดลอง

- 2 ขั้นตอนต่อไป ซึ่งเหมือนกับ E-DAT ข้อ 1 – 5 จึงสามารถนำผลการทดลองมาใช้กับ E-IAT ได้ โดยไม่ต้องทำการศึกษาซ้ำ

ผลการพัฒนาวิธี Flow Cytometric Thrombocyte Direct Antiglobulin Test (T-DAT)

- 1 ทดสอบหาจำนวนครั้งของการล้างเกล็ดเลือดที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบการล้าง 1, 2 & 3 ครั้ง พบว่าการล้าง 3 ครั้ง ให้ค่า different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของการล้าง Thrombocytes

MFI \ Wash	1 Time	2 Times	3 Times
MFI of AITP Platelets	0.889	1.282	1.671
MFI of Normal Platelets	0.682	0.675	0.679
Different MFI	0.207	0.607	0.992

พบว่าการล้าง 3 ครั้ง ให้ค่า different MFI สูงสุด จึงเลือกใช้ขั้นตอนการทดลอง

- 2 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเกล็ดเลือดหลังจากการล้างแล้ว โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % Platelets ใน PBS พบว่าการใช้ 0.5 % platelet suspension ใช้เวลานับเหมาะสมที่สุด ไม่เร็วหรือช้าเกินไป และการใช้ 0.5 % platelet suspension ให้ค่า different MFI เหมาะสมที่สุด จึงเลือกใช้ขั้นตอนการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 13 – 14

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบระยะเวลาการนับครบ 50,000 ของ % Platelet Suspension

% Platelet Suspension →	0.125 %	0.25 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %
Time of Flow Cytometry (Sec) ↓					
AITP Platelets	> 300	275	138	89	53
Normal Platelets	> 300	253	129	77	48

พบว่าการใช้ 0.5 % platelet suspension ใช้เวลาเหมาะสมที่สุด ไม่เร็วหรือช้าเกินไป

จึงเลือกใช้ขั้นตอนการทดลอง

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบ **Mean Fluorescent Intensity (MFI)** ของ **% Platelet**

Suspension

% Platelet Suspension →	0.125 %	0.25 %	0.5 %	1.0 %	2.0 %
MFI ↓					
MFI of AITP Platelets	1.782	1.767	1.683	1.449	1.259
MFI of Normal Platelets	0.687	0.677	0.645	0.643	0.639
Different MFI	1.095	1.090	1.038	0.806	0.620

พบว่าการใช้ 0.5 % platelet suspension ให้ค่า different MFI เหมาะสมที่สุด โดยมี
ระยะเวลาที่เหมาะสมด้วย จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

- ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiglobulin reagent ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการ
ทำปฏิกิริยากับเกล็ดเลือดที่ล้างแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นที่ dilution 1:10 เปรียบเทียบ
ปริมาตรที่ใช้ที่ 20, 40, 60, 80 & 100 μL รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 & 37 $^{\circ}\text{C}$
และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที พบว่า การใช้
AHG-FITC ที่ปริมาตร 75 μL บ่มที่ 25 $^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที มี different MFI เหมาะสม จึง
เลือกใช้ตลอดการทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 15 – 17

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของปริมาณ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate (AHG-FITC) ที่ dilute 1:10

Volume of AHG-FITC (μL) →	25	50	75	100
MFI ↓				
MFI of AITP Platelets	1.112	1.223	1.678	1.708
MFI of Normal Platelets	0.628	0.667	0.679	0.686
Different MFI	0.484	0.556	0.999	1.022

พบว่าการใช้ AHG-FITC ที่ปริมาตร 75 μL มี different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของอุณหภูมิที่ใช้บ่มกับ Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate

Incubation Temperature ($^{\circ}\text{C}$) →	4	25	37
MFI ↓			
MFI of AITP Platelets	1.113	1.796	1.823
MFI of Normal Platelets	0.657	0.673	0.681
Different MFI	0.456	1.123	1.142

พบว่าการบ่มกับ AHG-FITC ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ มี different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาที่ใช้บ่มกับ

Anti-Human Globulin Conjugated Fluorescein Isothiocyanate

Incubation Time (Min) →	20	30	40	50	60
MFI ↓					
MFI of AITP Platelets	1.463	1.681	1.673	1.683	1.694
MFI of Normal Platelets	0.652	0.667	0.671	0.674	0.668
Different MFI	0.811	1.014	1.002	1.009	1.026

พบว่าระยะเวลาที่ใช้บ่มกับ AHG-FITC ที่ 30 นาที มี different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ตลอดการทดลอง

- ทดสอบหาความเข้มข้นของ formaldehyde ที่เหมาะสมในการตรึง Plt เก็บไว้ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ได้ทันที โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.25, 0.5, 1.0 & 2.0 % ของ formaldehyde ใน PBS พบว่าการใช้ formaldehyde ที่ทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อ different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ที่ 1% ตลอดการทดลอง เนื่องจากเตรียมง่าย ดังแสดงใน ตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของความเข้มข้น (%) ของ

Formaldehyde

Concentration of Formaldehyde (%) →	0.25	0.5	1.0	2.0
MFI ↓				
MFI of AITP Platelets	1.669	1.672	1.679	1.675
MFI of Normal Platelets	0.654	0.667	0.663	0.681
Different MFI	1.015	1.005	1.016	0.994

พบว่าการใช้ formaldehyde ที่ทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อ different MFI เหมาะสม จึงเลือกใช้ที่

1% ตลอดการทดลอง เนื่องจากเตรียมง่าย

- ทดสอบความคงตัวของ Plt ที่ผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้ว ที่เก็บไว้ในตู้เย็น (refrigerator) ได้เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 0, 2, 3, 5 & 7 วัน พบว่าการเก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน ในตู้เย็น ไม่มีผลต่อ Different MFI จึงสามารถอ่านผลด้วย flow cytometry ได้ภายใน 7 วัน ดังแสดงใน ตารางที่ 19

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการเก็บ

Platelets ไว้ในตู้เย็น ก่อนการทำ Flow Cytometry

Time of Storage (Day) →	0	1	3	5	7
MFI ↓					
MFI of AITP Platelets	1.692	1.684	1.677	1.683	1.672
MFI of Normal Platelets	0.655	0.652	0.669	0.673	0.679
Different MFI	1.037	1.032	1.008	1.010	0.993

พบว่า การเก็บไว้ไม่เกิน 7 วัน ในตู้เย็น ไม่มีผลต่อ Different MFI จึงสามารถอ่านผลด้วย flow cytometry ได้ภายใน 7 วัน

ผลการพัฒนาวิธี Flow Cytometric Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test (T-IAT)

- ทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.5% fix-washed Plt suspension ใน PBS ปริมาตร 12.5 μL กับ serum ผู้ป่วย ปริมาตร 50 μL ที่ dilution: Undilute, 1:10, 1:100 & 1:1000 รวมทั้งเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 4, 25 (RT) & 37 $^{\circ}\text{C}$ และเปรียบเทียบระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ 20, 30, 40, 50 & 60 นาที พบว่าการใช้ undiluted serum ที่ปริมาตร 50 μL ต่อ 5% platelet suspension ปริมาตร 25 μL บ่มที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ นาน 30 ถึง 60 นาที มี Different MFI สูงไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ 30 นาที ตลอดจนทดลอง ดังแสดงใน ตารางที่ 20 – 22

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของ Serum Dilution ที่ใช้

ทำปฏิกิริยากับ 0.5% Thrombocyte Suspension

50 μ L of Diluted Serum at (%) $\rightarrow$	Undilute	1:10	1:100	1:1000
MFI $\downarrow$				
MFI of AITP Serum	1.783	1.429	1.031	0.682
MFI of Normal Serum	0.673	0.666	0.654	0.648
Different MFI	1.110	0.763	0.377	0.034

พบว่าการใช้ undiluted serum ที่ปริมาตร 50 μ L ต่อ 5% platelet suspension ปริมาตร 25 μ L

ให้ค่า different MFI สูงที่สุด จึงเลือกใช้ลดการทดลอง

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) อุณหภูมิที่ใช้บ่ม Serum กับ

0.5% Platelet Suspension

Temperature ($^{\circ}$ C) $\rightarrow$	4	25	37
MFI $\downarrow$			
MFI of AITP Serum	1.073	1.527	1.719
MFI of Normal Serum	0.662	0.671	0.659
Different MFI	0.411	0.856	1.060

พบว่าการใช้อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C บ่ม serum กับ platelets ให้ค่า different MFI สูงที่สุด จึงเลือกใช้

ลดการทดลอง

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบ Mean Fluorescent Intensity (MFI) ของระยะเวลาในการบ่ม

Serum กับ 0.5% Platelet Suspension

Time of Incubation (Min) →	20	30	40	50	60
MFI ↓					
MFI of AITP Serum	1.532	1.682	1.685	1.686	1.681
MFI of Normal Serum	0.641	0.654	0.653	0.657	0.674
Different MFI	0.891	1.028	1.032	1.029	1.007

พบว่าระยะเวลาในการบ่ม ตั้งแต่ 30 ถึง 60 นาที มี Different MFI สูงไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้

30 นาที ตลอดการทดลอง

- 2 ขั้นตอนต่อไป ซึ่งเหมือนกับ T-DAT ข้อ 1 – 5 จึงสามารถนำผลการทดลองมาใช้กับ T-IAT ได้ โดยไม่ต้องทำการศึกษาซ้ำ

ผลสรุปวิธีการตรวจ Direct Antiglobulin Test (DAT) ด้วย Flow Cytometry (FC)

Erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT)

ใช้ 5% RBC suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μL ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed RBC suspension โดยการเติม 250 μL ของ 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ใช้ 75 μL ของ 0.5 % washed RBC suspension ผสมกับ 75 μL ของ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งเครื่องให้นับ 50,000 RBC ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log

forward scatter และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ RBC ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

Thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT)

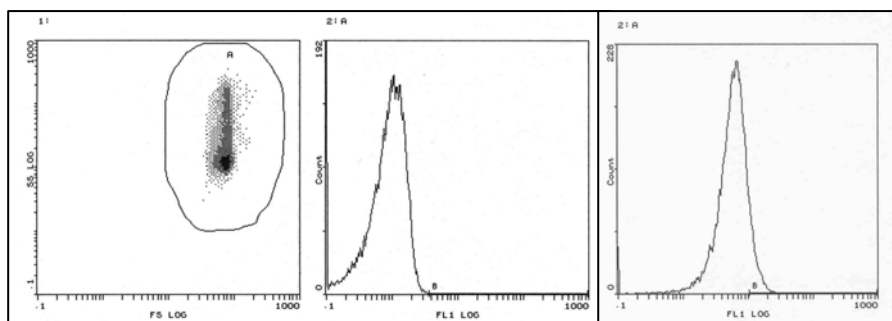
ใช้ 5% Plt suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μL ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed Plt suspension โดยการเติม 250 μL ของ 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ใช้ 75 μL ของ 0.5 % washed Plt suspension ผสมกับ 75 μL ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้เครื่องนับ 50,000 Plt ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ Plt ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

ผลสรุปวิธีการตรวจ Indirect Antiglobulin Test (IAT) ด้วย Flow Cytometry (FC)

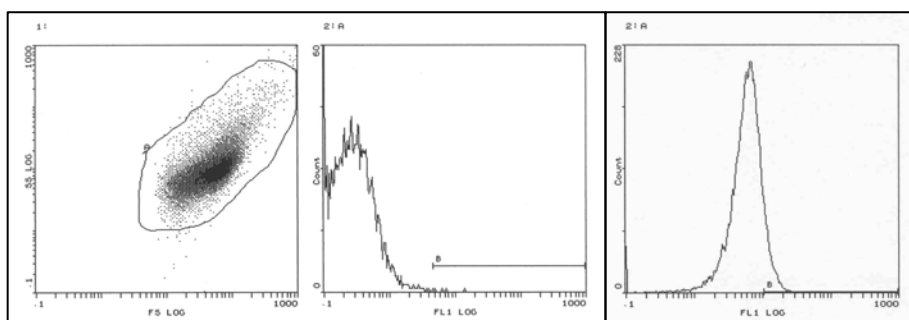
Erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT)

ใช้ 5% Screening group O RBC suspension ที่ได้มาจากสภากาชาดไทย นำมาเตรียม glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน แล้วจึงใช้ 25 μL ของ glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ทำปฏิกิริยากับ 50 μL ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับ 75 μL ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้นับ 50,000 RBC ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter

และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ serum ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control



ภาพที่ 1 Flow Cytometric Histogram ของ Erythrocyte Antiglobulin Test



ภาพที่ 2 Flow Cytometric Histogram ของ Thrombocyte Antiglobulin Test

Thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT)

ใช้ group O expired platelet concentrate จากสภากาชาดไทย นำมาเตรียมเป็น 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde fix-washed 0.5 % Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน แล้วจึงใช้ 25 μ L ของ Plt suspension ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยากับ 75 μ L ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นเติม 500 μ L ของ 1% formaldehyde ใน

0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้นับ 50,000 PIt ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log FL1 (green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ serum ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

ผลการพัฒนาชุดน้ำยาตรวจ Flow Cytometric Antiglobulin Test

จากสภาวะที่เหมาะสมแล้วที่ได้ นำมาเตรียมชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ที่สามารถตรวจได้ทั้ง 4 parameters (E-DAT, E-IAT, T-DAT & T-IAT) ใน น้ำยาชุดเดียว ซึ่งประกอบด้วย

1. Diluent ได้แก่ 0.1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (0.1% BSA-PBS)
2. Erythrocyte fixative solution ได้แก่ 0.05% glutaraldehyde ใน 0.1%BSA-PBS
3. Thrombocyte fixative solution ได้แก่ 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS
4. Secondary antibody ได้แก่ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC)
5. Fix-for-Flow solution ได้แก่ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS

ผลการศึกษาความคงตัวของชุดน้ำยาตรวจ Flow Cytometric Antiglobulin Test

ศึกษาความคงตัวของชุดน้ำยาที่เตรียมได้ ที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยทำการตรวจทั้ง E-IAT และ T-IAT ในตัวอย่าง serum ผู้ป่วย AIHA และ AITP ตามลำดับ ที่แยกเป็น aliquats เก็บไว้ใน freezer -20 °C แล้วนำออกมาละลายทีละ 1 aliquat เพื่อทำการตรวจ เดือนละครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน รวม 6 ครั้ง พบว่า mean $\pm$ standard deviation

และ percent coefficient of variation ของ different MFI ของ serum ผู้ป่วย AIHA 1 ราย คือ 1.018 ± 0.050 และ 4.945% ตามลำดับ และของ serum ผู้ป่วย AITP 1 ราย คือ 1.385 ± 0.176 และ 12.73% ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 23 – 24

ตารางที่ 23 ความคงตัวของน้ำยาตรวจ เมื่อใช้ตรวจ E-IAT ใน Serum ผู้ป่วย AIHA

Replicate	1	2	3	4	5	6	Mean	S.D.	%CV
Defferent MFI	0.988	1.023	1.034	1.117	0.962	0.985	1.018	0.050	4.945

Defferent MFI = MIF of AIHA serum – MFI of Normal serum

ตารางที่ 24 ความคงตัวของน้ำยาตรวจ เมื่อใช้ตรวจ T-IAT ใน Serum ผู้ป่วย AITP

Replicate	1	2	3	4	5	6	Mean	S.D.	%CV
Defferent MFI	1.233	1.450	1.098	1.375	1.612	1.544	1.385	0.176	12.73

Defferent MFI = MIF of AITP serum – MFI of Normal serum

ผลการเปรียบเทียบค่า Flow Cytometric และ Standard Tube Test ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test (E-DAT) และ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test (E-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ

ผลการเปรียบเทียบค่า flow cytometry (FC) ซึ่งแสดงผลเป็น mean fluorescent intensity (MFI) และแสดงผลเป็น grading of agglutination (GA) ของ standard tube test (STT) ซึ่งของ E-DAT และ E-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ ตัวอย่างเลือดได้จาก กลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง (AIHA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (routatoid arthritis, RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases, NAD, n = 50)

และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ดังแสดงค่าเป็น MFI ใน FC และ grading of agglutination

(GA:- 4+, 3+, 2+, 1+ & 0) ใน STT ของ E-DAT และ E-IAT ใน ตารางที่ 25 – 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 25 ผลการตรวจแสดงเป็น MFI ของ Flow Cytometry และ GA ของ Standard

Tube Test ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test (E-DAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ

Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
1	2.111	3	0.564	0	0.166	0	0.111	0
2	1.642	2	0.354	0	0.236	0	0.234	0
3	3.077	2	0.542	0	0.238	0	0.216	0
4	1.835	1	0.851	0	0.965	0	0.375	0
5	3.512	1	2.29	1	0.842	0	0.215	0
6	3.521	2	0.568	0	0.852	0	0.364	0
7	1.856	3	0.112	0	0.654	0	0.854	0
8	1.854	2	0.365	0	0.365	0	0.239	0
9	1.236	2	0.854	0	0.123	0	0.257	0
10	1.584	2	0.365	0	0.425	0	0.168	0
11	1.223	1	0.332	0	0.368	0	0.397	0
12	1.568	2	0.654	0	0.258	0	0.234	0
13	1.697	2	0.254	0	0.365	0	0.685	0
14	2.541	3	0.256	0	0.345	0	0.369	0

ตารางที่ 25 ต่อ

Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
15	2.111	1	0.365	0	0.682	0	0.459	0
16	1.546	1	0.485	0	0.568	0	0.623	0
17	1.368	1	0.687	0	0.369	0	0.643	0
18	1.987	2	0.553	0	0.258	0	0.524	0
19	1.654	2	1.122	1	0.254	0	0.121	0
20	1.235	1	0.368	0	0.851	0	0.235	0
21	1.364	1	0.751	0	0.365	0	0.224	0
22	1.258	1	0.763	0	0.965	0	0.536	0
23	1.669	1	0.268	0	0.365	0	0.395	0
24	2.345	2	0.347	0	0.254	0	0.586	0
25	3.412	2	0.598	0	0.365	0	0.566	0
26	2.365	1	0.395	0	0.785	0	0.452	0
27	3.812	3	0.367	0	0.254	0	0.368	0
28	1.368	1	1.239	1	0.124	0	0.587	0
29	2.134	1	0.354	0	0.258	0	0.954	0
30	2.456	1	0.333	0	0.354	0	0.125	0
31	2.531	2	0.564	0	0.368	0	0.564	0
32	1.369	2	0.587	0	0.452	0	0.369	0

ตารางที่ 25 ต่อ

Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
33	1.548	2	0.654	0	0.254	0	0.387	0
34	1.695	2	0.998	1	0.222	0	0.546	0
35	1.332	1	1.114	1	0.258	0	0.685	0
36	1.234	1	0.753	0	0.457	0	0.956	0
37	2.015	1	0.654	0	0.369	0	0.364	0
38	2.114	1	0.822	0	0.465	0	0.532	0
39	1.534	1	0.854	0	0.335	0	0.669	0
40	1.254	2	0.753	0	0.254	0	0.584	0
41	1.368	2	0.456	0	0.125	0	0.156	0
42	1.229	2	0.365	0	0.346	0	0.365	0
43	1.953	2	0.558	0	0.652	0	0.665	0
44	1.236	1	0.653	0	0.218	0	0.352	0
45	1.254	1	0.537	0	0.584	0	0.456	0
46	2.111	3	0.554	0	0.664	0	0.238	0
47	2.004	1	0.998	1	0.325	0	0.965	0
48	1.546	1	0.365	0	0.158	0	0.365	0
49	1.368	1	0.365	0	0.554	0	0.158	0
50	2.011	1	0.235	0	0.842	0	0.853	0

ตารางที่ 25 ต่อ

Sample →	AIHA	AIHA	RA	RA	NAD	RA	Normal	Normal
Number ↓	MFI	GA	MFI	GA	MFI	GA	MFI	GA
Mean	1.880	1.600	0.603	0.120	0.423	0	0.452	0
S.D.	0.659	0.670	0.351	0.328	0.230	0	0.227	0

ตารางที่ 26 ผลการตรวจแสดงเป็น MFI ของ Flow Cytometry และ GA ของ Standard**Tube Test ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test (E-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ**

Sample →	AIHA	AIHA	RA	RA	NAD	NAD	Normal	Normal
Number ↓	MFI	GA	MFI	GA	MFI	GA	MFI	GA
1	2.222	2	0.158	0	0.951	0	0.978	0
2	2.411	2	0.225	0	0.368	0	0.685	0
3	43.151	2	0.235	0	0.587	0	0.977	0
4	1.489	1	0.954	0	0.699	0	0.653	0
5	0.987	0	2.311	1	0.648	0	0.578	0
6	0.128	1	0.587	0	0.851	0	0.546	0
7	0.987	1	0.987	0	0.672	0	0.368	0
8	1.123	1	0.368	0	0.528	0	0.547	0
9	1.022	1	0.668	0	0.472	0	0.368	0
10	1.397	1	0.697	0	0.684	0	0.546	0
11	0.876	0	0.853	0	0.688	0	0.875	0

ตารางที่ 26 ต่อ

Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
12	0.985	1	0.654	0	0.654	0	0.684	0
13	0.898	1	0.874	0	0.568	0	0.569	0
14	1.238	2	0.886	0	0.91	0	0.964	0
15	2.11	1	0.854	0	0.854	0	0.635	0
16	2.345	1	0.358	0	0.367	0	0.687	0
17	2.124	1	0.682	0	0.852	0	0.548	0
18	0.988	1	0.854	0	0.364	0	0.965	0
19	0.973	1	1.125	1	0.852	0	0.128	0
20	0.654	0	0.568	0	0.642	0	0.368	0
21	0.687	0	0.357	0	0.235	0	0.358	0
22	0.659	1	0.369	0	0.368	0	0.698	0
23	0.964	1	0.867	0	0.654	0	0.547	0
24	2.114	1	0.586	0	0.843	0	0.568	0
25	1.011	0	0.689	0	0.364	0	0.687	0
26	0.963	0	0.846	0	0.357	0	0.695	0
27	2.368	2	0.852	0	0.846	0	0.687	0
28	2.457	1	1.234	1	0.365	0	0.856	0
29	0.897	0	0.664	0	0.341	0	0.847	0

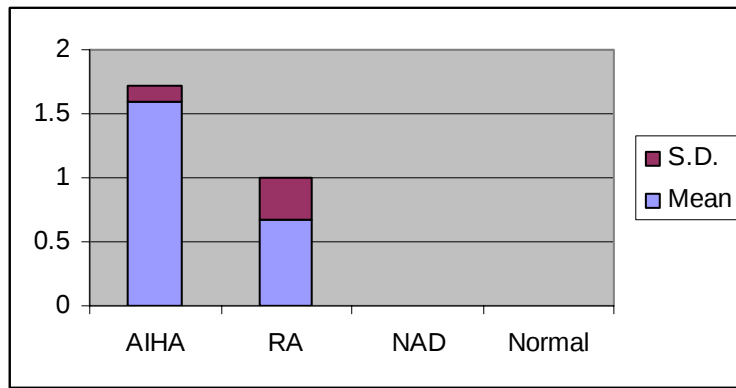
ตารางที่ 26 ต่อ

Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
30	1.006	0	0.568	0	0.354	0	0.658	0
31	2.368	1	0.678	0	0.847	0	0.358	0
32	2.578	1	0.985	0	0.364	0	0.655	0
33	0.238	0	0.846	0	0.547	0	0.864	0
34	0.856	0	0.367	0	0.368	0	0.984	0
35	3.267	1	0.642	0	0.648	0	0.869	0
36	1.009	0	0.234	0	0.386	0	0.854	0
37	2.341	1	0.685	0	0.654	0	0.768	0
38	3.112	1	0.546	0	0.657	0	0.822	0
39	2.126	1	0.873	0	0.387	0	0.543	0
40	2.856	1	0.654	0	0.368	0	0.654	0
41	0.698	0	0.354	0	0.874	0	0.668	0
42	0.856	1	0.568	0	0.654	0	0.587	0
43	0.765	0	0.354	0	0.654	0	0.659	0
44	0.684	0	0.475	0	0.398	0	0.587	0
45	1.368	1	0.753	0	0.845	0	0.694	0
46	1.584	1	0.563	0	0.697	0	0.856	0
47	1.239	1	0.998	1	0.777	0	0.664	0

ตารางที่ 26 ต่อ

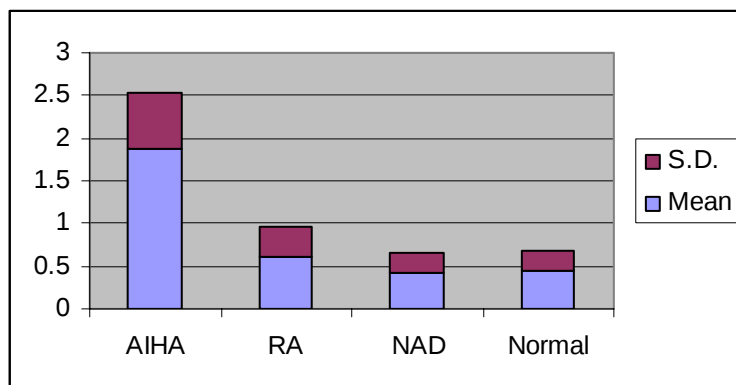
Sample → Number ↓	AIHA MFI	AIHA GA	RA MFI	RA GA	NAD MFI	NAD GA	Normal MFI	Normal GA
48	0.965	0	0.367	0	0.658	0	0.584	0
49	0.897	0	0.568	0	0.367	0	0.657	0
50	1.026	0	0.489	0	0.549	0	0.689	0
Mean	2.241	0.760	0.678	0.080	0.592	0	0.665	0
S.D.	5.952	0.624	0.341	0.274	0.197	0	0.183	0

พบว่า E-DAT โดยวิธี standard tube test (STT) ซึ่งแสดงผลเป็น grading of agglutination (GA:- 4+, 3+, 2+, 1+ & 0) ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่า GA ใน ตัวอย่างเลือด ผู้ป่วย AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) และกลุ่มคนปกติ (n = 50) คือ 1.60 ± 0.67 , 0.12 ± 0.33 , 0.00 ± 0.00 & 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ ซึ่งค่า GA ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า GA ในผู้ป่วย RA สูงกว่าอีก 2 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า GA ในผู้ป่วย NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่า MFI โดยวิธี flow cytometry (FC) คือ 1.88 ± 0.66 , 0.60 ± 0.35 , 0.42 ± 0.23 & 0.45 ± 0.23 ตามลำดับ ซึ่งค่า MFI ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 Grading of Agglutination ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test

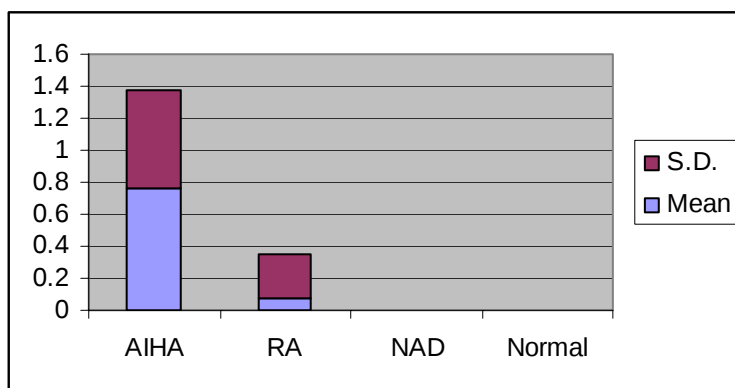
AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า grading of agglutination ใน AIHA สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และใน RA สูงกว่าใน NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)



ภาพที่ 4 Mean Fluorescent Intensity ของ Erythrocyte Direct Antiglobulin Test

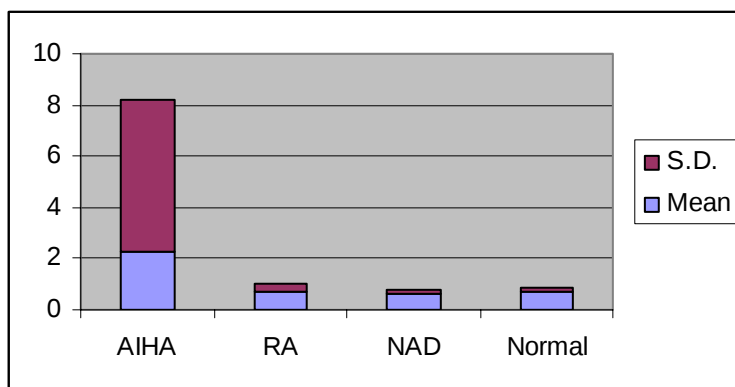
AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า MFI ใน AIHA สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน RA, NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

สำหรับ E-IAT โดยวิธี standard tube test (STT) ซึ่งแสดงผลเป็น grading of agglutination (GA:- 4+, 3+, 2+, 1+ & 0) ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของค่า GA ใน ตัวอย่างเลือด ผู้ป่วย AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) และกลุ่มคนปกติ (n = 50) คือ 0.76 ± 0.62 , 0.08 ± 0.27 , 0.00 ± 0.00 & 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ ซึ่งค่า GA ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า GA ในผู้ป่วย RA สูงกว่าอีก 2 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า GA ในผู้ป่วย NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 5 สำหรับ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ ค่า MFI โดยวิธี flow cytometry (FC) คือ 2.24 ± 5.95 , 0.68 ± 0.34 , 0.59 ± 0.20 & 0.67 ± 0.18 ตามลำดับ ซึ่งค่า MFI ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงใน ภาพที่ 6



ภาพที่ 5 Grading of Agglutination ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rhumatiod arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า grading of agglutination ใน AIHA สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน RA, NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)



ภาพที่ 6 Mean Fluorescent Intensity ของ Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า MFI ใน AIHA สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน RA, NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบค่า Flow Cytometric Thrombocyte Direct Antiglobulin Test (T-DAT) และ Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test (T-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ

ผลการเปรียบเทียบค่า Flow Cytometric (FC) ซึ่งแสดงผลเป็น mean fluorescent intensity (MFI) ของ T-DAT และ T-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ ตัวอย่างเลือดได้จาก กลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง (AITP, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (rheumatoid arthritis, RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases, NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ดังแสดงค่าเป็น MFI ของ T-DAT และ T-IAT ใน ตารางที่ 27 – 28 ตามลำดับ

ตารางที่ 27 ผลการตรวจ Flow Cytometric T-DAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
1	4.257	0.548	0.878	0.365
2	3.541	0.687	0.854	0.357
3	2.354	0.987	0.685	0.586
4	4.258	0.548	0.654	0.458
5	3.251	4.411	0.365	0.411
6	3.657	0.867	0.842	0.369
7	2.598	0.698	0.808	0.874
8	2.368	0.857	0.567	0.354
9	4.268	0.875	0.706	0.65
10	3.571	0.687	0.835	0.304
11	3.664	0.588	0.604	0.333
12	2.547	0.697	0.658	0.546
13	2.654	0.587	0.591	0.687
14	2.368	0.368	0.635	0.548
15	2.397	0.658	0.752	0.679
16	1.987	0.874	0.843	0.365
17	1.687	0.854	0.874	0.425
18	2.368	0.236	0.854	0.574

ตารางที่ 27 ต่อ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
19	1.698	2.354	0.567	0.685
20	2.567	0.698	0.821	0.801
21	2.145	0.875	0.654	0.254
22	2.147	0.864	0.564	0.369
23	2.158	0.687	0.368	0.351
24	2.154	0.723	0.705	0.845
25	2.364	0.684	0.847	0.766
26	1.987	0.666	0.654	0.568
27	2.145	0.587	0.549	0.564
28	2.037	2.357	0.608	0.845
29	2.111	0.357	0.784	0.642
30	1.087	0.854	0.654	0.555
31	1.258	0.687	0.368	0.657
32	1.224	0.699	0.548	0.548
33	1.867	0.875	0.65	0.364
34	2.165	0.658	0.508	0.452
35	2.148	0.468	0.642	0.505
36	2.534	0.942	0.683	0.528

ตารางที่ 27 ต่อ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
37	3.124	0.901	0.653	0.602
38	2.547	0.68	0.454	0.365
39	1.985	0.87	0.852	0.59
40	1.875	0.368	0.754	0.542
41	1.899	0.842	0.365	0.763
42	2.178	0.877	0.567	0.663
43	1.854	0.685	0.209	0.562
44	1.687	0.654	0.365	0.368
45	0.988	0.854	0.845	0.391
46	1.238	0.238	0.608	0.543
47	1.587	0.987	0.555	0.658
48	1.287	0.811	0.704	0.648
49	2.544	0.754	0.822	0.58
50	1.354	0.655	0.468	0.364
Mean	2.314	0.844	0.648	0.536
S.D.	0.807	0.634	0.162	0.157

ตารางที่ 28 ผลการตรวจ Flow Cytometric T-IAT ในผู้ป่วยกับคนปกติ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
1	1.234	0.682	0.368	0.238
2	0.687	0.587	0.368	0.357
3	0.368	0.438	0.584	0.687
4	2.354	0.564	0.684	0.597
5	1.365	0.708	0.537	0.368
6	0.687	0.364	0.368	0.698
7	0.369	0.528	0.548	0.367
8	1.238	0.957	0.657	0.584
9	1.387	0.368	0.554	0.369
10	2.365	0.666	0.605	0.548
11	1.354	0.544	0.365	0.465
12	0.698	0.635	0.547	0.505
13	1.354	0.658	0.523	0.364
14	2.365	0.658	0.349	0.874
15	1.587	0.689	0.605	0.694
16	0.368	0.871	0.867	0.587
17	0.569	0.987	0.695	0.654
18	1.238	0.658	0.654	0.658

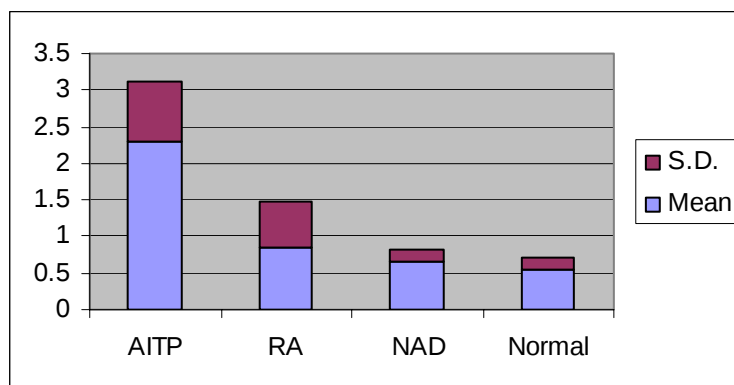
ตารางที่ 28 ต่อ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
19	2.333	1.234	0.845	0.369
20	2.547	0.654	0.654	0.485
21	2.365	0.608	0.875	0.548
22	1.025	0.587	0.368	0.654
23	0.847	0.641	0.699	0.592
24	0.886	0.58	0.536	0.364
25	0.697	0.368	0.605	0.214
26	1.254	0.754	0.438	0.587
27	1.368	0.608	0.567	0.654
28	1.369	1.605	0.362	0.534
29	0.874	0.705	0.359	0.606
30	0.369	0.635	0.683	0.67
31	1.545	0.365	0.546	0.85
32	0.899	0.658	0.354	0.365
33	1.368	0.658	0.504	0.366
34	2.025	0.874	0.651	0.548
35	2.333	0.654	0.365	0.549
36	1.258	0.987	0.333	0.548

ตารางที่ 28 ต่อ

Sample of → Number ↓	AITP MFI	RA MFI	NAD MFI	Normal MFI
37	1.038	1.021	0.549	0.697
38	0.654	0.365	0.658	0.777
39	0.957	0.645	0.365	0.63
40	0.857	0.468	0.654	0.363
41	1.354	0.568	0.326	0.505
42	2.365	0.869	0.653	0.548
43	2.534	0.654	0.543	0.487
44	2.368	0.365	0.564	0.765
45	2.111	0.808	0.554	0.235
46	0.857	0.658	0.351	0.548
47	0.687	0.961	0.308	0.699
48	2.314	0.659	0.654	0.549
49	2.111	0.368	0.732	0.357
50	0.687	0.659	0.365	0.638
Mean	1.356	0.676	0.537	0.538
S.D.	0.684	0.233	0.151	0.155

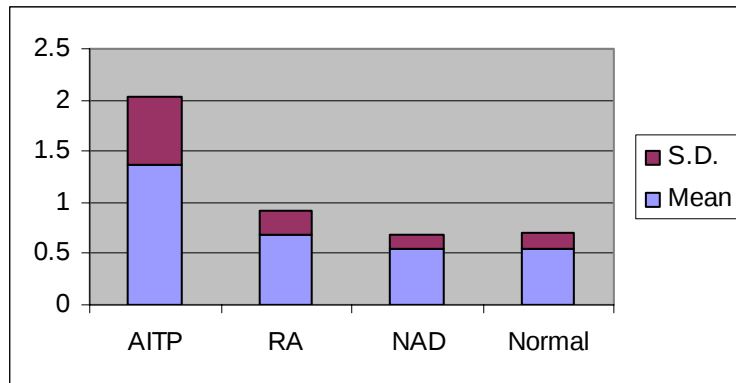
พบว่า T-DAT ใน ตัวอย่างเลือด ผู้ป่วย AITP (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) และกลุ่มคนปกติ (n = 50) โดยวิธี flow cytometry (FC) คือ 2.31 ± 0.81 , 0.84 ± 0.63 , 0.65 ± 0.16 & 0.54 ± 0.16 ตามลำดับ ซึ่งค่า MFI ในผู้ป่วย AITP สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 Mean Fluorescent Intensity ของ Thrombocyte Direct Antiglobulin Test

AITP = autoimmune thrombocytopenia (n = 50), RA = rhumatiod arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า MFI ใน AITP สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน RA, NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

สำหรับ T-IAT พบว่า ในตัวอย่างเลือด ผู้ป่วย AITP (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) และกลุ่มคนปกติ (n = 50) โดยวิธี flow cytometry (FC) คือ 1.36 ± 0.68 , 0.68 ± 0.23 , 0.54 ± 0.15 & 0.54 ± 0.16 ตามลำดับ ซึ่งค่า MFI ในผู้ป่วย AITP สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 Mean Fluorescent Intensity ของ Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test

AITP = autoimmune thrombocytopenia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) และ Normal = คนปกติ (n = 50) ค่า MFI ใน AITP สูงกว่าใน RA, NAD และ Normal อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ใน RA, NAD และ Normal ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

บทที่ 4

วิจารณ์

การพัฒนาวิธี flow cytometric erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT)

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในทุกขั้นตอน พบว่าขั้นตอนที่เหมาะสม คือ ใช้ 5% RBC suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μL ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed RBC suspension โดยการเติม 250 μL ของ 0.1% BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี ใช้ 75 μL ของ 0.5 % washed RBC suspension ผสมกับ 75 μL ของ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติม 500 μL ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งเครื่องให้นับ 50,000 RBC ที่ low flow rate หรือให้มี อัตราการไหลของ RBC ผ่านลำแสง laser ไม่เกิน 1,000 RBC ต่อ second โดยใช้ ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log fluorescent detector 1 (FL1, green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ RBC ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

วิธีการนี้ สะดวก รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างเลือดน้อย ล้าง RBC เพียง 3 ครั้ง ตามมาตรฐานทางธนาคารเลือดโดยทั่วไป เพื่อกำจัด auto-antibodies ใน serum ที่ไม่ได้เกาะกับ RBC ออกไปให้หมด แล้วจึงเตรียมเป็น 0.5% washed RBC suspension เนื่องจากวิธี flow cytometry ใช้ RBC ในจำนวนที่น้อยกว่าวิธี standard tube test อย่างมาก ดังนั้นการใช้ เพียง 0.5% ในปริมาตรเพียง 75 μL ก็เพียงพอ สำหรับทำปฏิกิริยากับ 75 μL ของ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS เหตุที่ต้องใช้ F(ab)'2 เนื่องจากเป็น fragment ที่ไม่มี Fc เพื่อหลีกเลี่ยงการจับอย่าง non-

specific ของ Fc กับผิวของ RBC และที่เลือกใช้สีเรืองแสงชนิด fluorescein isothiocyanate (FITC) เพราะว่า ให้สัญญาณการเรืองแสงที่เข้ม มีราคาถูก และเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย การ dilute 1:10 ก็เพื่อความประหยัด และช่วยลด non-specific binding ได้ด้วย และที่ใช้ 0.1% BSA-PBS เป็น diluent ก็เพราะ หาได้ง่าย ราคาไม่แพง และยังช่วยลด non-specific binding ได้อีกทางหนึ่ง การบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ก็เป็นระยะเวลาและอุณหภูมิมาตรฐาน ไม่สั้นหรือยาวเกินไป ที่ปฏิกิริยา Ag-Ab สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับการบ่มในที่มืดนั้น ก็เพื่อไม่ให้ fluorescent dye สัมผัสกับแสงสว่าง เพราะจะทำให้มันถูกกระตุ้นก่อนถึงเวลาที่ เหมาะสมได้ เมื่อถึงเวลานำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer อาจจะทำให้สัญญาณการเรืองแสง ต่ำกว่าที่ควรจะเป็นได้ เนื่องจากสีเรืองแสงได้ถูกกระตุ้นด้วยแสงสว่างไปก่อนแล้ว การตรึง สภาพด้วย 500 μ L ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ที่นอกจากจะเป็นการ dilute ตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของ RBC เหมาะสมต่อการนับด้วยเครื่อง flow cytometer แล้ว ยัง ช่วย fix ให้ RBC มีสภาพคงที่ รวมทั้งยังช่วยรักษาคูณสมบัติการเรืองแสงของ FITC ไว้ได้นาน อีกด้วย เมื่อเก็บไว้ใน refrigerator ในที่มืด โดยเฉพาะเมื่อไม่สามารถตรวจวัดได้ทันที เนื่องจาก เครื่อง flow cytometer ไม่ว่าง หรือมีปัญหา หรือหมดเวลาทำงาน โดยจะสามารถนำมาตรวจวัด ได้เมื่อพร้อม ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 วัน โดยที่ยังคงให้ค่า mean fluorescent intensity (MFI) ไม่เปลี่ยนแปลงไป จากการตรวจวัดในทันทีหลังการย้อมเสร็จ การตั้งเครื่องให้นับ 50,000 RBC ก็เพื่อให้มีความน่าเชื่อถือสูง เนื่องจากการจากนับ RBC จำนวนมาก ซึ่งมากกว่าการดูด้วย กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงหลายเท่า ทำให้ flow cytometry น่าเชื่อถือมากกว่า fluorescent microscopy อย่างมาก การใช้ที่ low flow rate หรือให้มี อัตราการไหลของ RBC ผ่านลำแสง laser ไม่เกิน 1,000 RBC ต่อ second เพื่อไม่ให้ RBC ไหล ไกลกันมากเกินไป จะทำให้เครื่อง ไม่สามารถแยกได้ว่า เป็น RBC ขนาดใหญ่ 1 ตัว หรือเป็น RBC ขนาดปกติ 2 ตัว ที่ไหลใกล้กัน มากเกินไป ซึ่ง 1,000 RBC ต่อ second เป็นอัตราการไหลที่เหมาะสมของ RBC การใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter (LogSSc), log forward scatter (LogFsc) และ log

fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence ที่ 530 nm) ก็เพื่อใช้ LogSSc กับ LogFsc ในการกำหนดประชากรของ RBC โดยการ gating ให้ครอบคลุมเฉพาะ RBC cloud ใน dot plot cytogram สำหรับการใช้ logFL1 ก็เพราะในการทดลองนี้ มีการย้อมสีเรืองแสง สีเขียวของ FITC เพียงสีเขียว จึงเปิด fluorescent detector เพียงตัวเดียว ที่สามารถรับสัญญาณเรืองแสงสีเขียวที่ 530 nm ได้ หรือเปิด LogFL1 เพียงตัวเดียวก็พอ โดยที่ FL2, FL3 และ FL4 สำหรับสีเรืองแสงสีอื่นๆ ไม่มีความจำเป็น การแสดงผลการตรวจเป็น mean fluorescent intensity (MFI) เพราะไม่สามารถใช้ % positive RBC ได้ เนื่องจากการทดลองแบบนี้ RBC ไม่มีการแยกกลุ่ม RBC ทุกเซลล์ มีสภาพเหมือนกัน หรือใกล้เคียงกันทั้งหมด ในการย้อมสีติดหรือไม่ติด หมายความว่าถ้าย้อมติดสี (positive) ก็จะติด RBC ทั้งหมด ถ้าย้อมไม่ติดสี (negative) ก็จะไม่ติด RBC ทั้งหมด ดังนั้นการแสดงผลเป็น MFI จึงถูกต้องและเหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม โดยธรรมชาติของ flow cytometry ถึงแม้จะเป็น negative RBC ของ normal control ก็ตาม จะมีการเรืองแสงแบบ auto-fluorescent อยู่ด้วย แต่ MFI จะไม่สูง ซึ่งสามารถนำ auto-fluorescent MFI ของ normal control นี้ มาใช้กำหนดเป็นค่า base line ที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยแต่ละคนได้ ว่ามี MFI สูงกว่า base line มากน้อยเท่าไร ทำให้ flow cytometry เป็น semi-quantitative measurement โดยถ้า MIF สูงกว่า base line มาก แสดงว่ามี auto-antibodies เกาะอยู่บน RBC มาก ถ้ามี MIF สูงกว่า base line เล็กน้อย แสดงว่ามี auto-antibodies เกาะอยู่บน RBC เพียงเล็กน้อย แต่ถ้ามี MIF เท่ากับหรือใกล้เคียงกับ base line แสดงว่าไม่มี auto-antibodies เกาะอยู่บน RBC หรือมีบ้าง ไม่แตกต่างจากคนปกติ ซึ่งหมายถึงยังอยู่ใน normal range หรือ negative test นั้นเอง

การพัฒนาวิธี flow cytometric thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT)

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในทุกขั้นตอน พบว่าขั้นตอนที่เหมาะสม คือ ใช้ 5% platelet (Plt) suspension ของผู้ป่วย ปริมาตร 25 μ L ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS จากนั้นเตรียมเป็น 0.5 % washed Plt suspension โดยการเติม 250 μ L ของ 0.1% BSA-PBS ผสม

ให้เข้ากันดี ใช้ 75 μ L ของ 0.5 % washed Plt suspension ผสมกับ 75 μ L ของ AGT-FITC ที่ dilute 1:10 ใน 0.1% BSA-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด จากนั้นเติม 500 μ L ของ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS ผสมให้เข้ากันดี นำไปตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer ที่ ตั้งให้นับ 50,000 Plt ใช้ detectors 3 ชนิด ได้แก่ log side scatter, log forward scatter และ log fluoest detector 1 (FL1, green fluorescence ที่ 530 nm) แสดงผลการตรวจ เป็น mean fluorescent intensity (MFI) เปรียบเทียบกับ Plt ของคนปกติ ที่ใช้เป็น normal control

โดยมีเหตุผลและคำอธิบายของแต่ละขั้นตอน คล้ายกันกับวิธี E-DAT ที่กล่าวถึงไปแล้ว ก่อนหน้านี้ เพียงแต่ใช้ Plt แทน RBC เท่านั้น โดยมีส่วนที่แตกต่างกันเพียง การ gating ให้ครอบคลุมเฉพาะ Plt cloud ใน dot plot cytogram ซึ่ง Plt clud จะมีค่า LogFSc ต่ำกว่า RBC clud เนื่องจาก Plt มี size เล็กกว่า RBC แต่จะมี LogSSc สูงกว่า RBC เนื่องจาก Plt มี granularity มากกว่า RBC นั้นเอง

การพัฒนาวิธี flow cytometric erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT)

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในทุกขั้นตอน พบว่าขั้นตอนที่เหมาะสม คือ ใช้ 5% screening group O RBC suspension ที่ได้มาจากสภากาชาดไทย นำมาเตรียมเป็น glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน แล้วจึงใช้ 25 μ L ของ glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยาต่อไป เหมือนกันกับวิธี E-DAT

สาเหตุที่ใช้ 5% screening group O RBC suspension จากสภากาชาดไทย เนื่องจาก หาซื้อได้ง่าย ราคาถูก คุณภาพคงที่ และยังมีตารางแสดง blood group antigen ครบในทุก blood group system ที่สำคัญอีกด้วย ซึ่งจะมีประโยชน์มาก ถ้าต้องการตรวจสอบหา specificity ของ auto-antibodies ที่ตรวจพบ ใน E-DAT หรือ E-IAT ก็ตาม ถ้าเป็น E-IAT positive

สามารถใช้ serum ตัวอย่าง นำไปตรวจสอบหา specificity ของ auto-antibodies โดยการทำ antibody identification กับ panel cells ของสมาคมฯไทย ได้เลย แต่ถ้าเป็น E-DAT positive จะต้องทำการ elute เอา auto-antibodies ที่จับกับ RBC ออกมาใน eluate ก่อน ด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น heat elution สำหรับ auto-antibodies ที่เป็น IgM หรือ ether elution สำหรับ auto-antibodies ที่เป็น IgG แล้วจึงจะนำเอา eluate ที่ได้มานั้น ไปทำ antibody identification กับ panel cells ของสมาคมฯไทย ต่อไป และสาเหตุผลที่นำ 5% screening group O RBC suspension มาเตรียมเป็น glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน ก็เพราะต้องการเก็บไว้ใช้งานได้ในระยะเวลานาน ส่วนเหตุผลที่ใช้ 25 μ L ของ glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension ทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย ก็เพราะมาตรฐานการทำปฏิกิริยาระหว่าง RBC กับ serum คือ 1:2 แล้วจึงบ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS เพื่อกำจัด unbound auto-antibodies ออกไปให้หมด แล้วจึงให้ทำการทดลองต่อไป เหมือนกันกับวิธี E-DAT

การพัฒนาวิธี flow cytometric thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT)

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในทุกขั้นตอน พบว่าขั้นตอนที่เหมาะสม คือ ใช้ group O expired platelet concentrate จากสมาคมฯไทย นำมาเตรียมเป็น 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde fix-washed 0.5 % Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน แล้วจึงใช้ 25 μ L ของ Plt suspension ที่ได้ มาทำปฏิกิริยากับ 50 μ L ของ undiluted serum ของผู้ป่วย บ่มใน 37 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้าง 3 ครั้งด้วย 0.1% BSA-PBS แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยาต่อไปเหมือนกับวิธี T-DAT

สาเหตุที่ใช้ group O expired platelet concentrate จากสมาคมฯไทย เนื่องจากเป็นของเหลือที่ไม่ได้ใช้งานแล้ว หาได้ง่าย ไม่ต้องซื้อ สาเหตุที่นำมาทำเป็น 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde fix-washed 0.5 % Plt suspension ใน 0.1% BSA-PBS ก่อน ก็เพราะมี

การศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่า การ fix ด้วย 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde นี้ ช่วยให้ Plt มีความคงตัวได้นาน และไม่มีผลกระทบต่อ ag-ab reaction สำหรับเหตุผลของขั้นตอนอื่นๆ เช่น อัตราส่วน Plt ต่อ serum อุณหภูมิ เวลา การทำปฏิกิริยา และการล้าง นั้นคล้ายกันกับวิธี E-IAT ที่กล่าวถึงไว้แล้วก่อนหน้านี้ สำหรับขั้นตอนต่อไปที่เหมือนกันกับวิธี T-DAT ก็มีเหตุผลและคำอธิบาย เช่นเดียวกันกับวิธี T-DAT ที่กล่าวถึงไว้แล้วก่อนหน้านี้ เช่นกัน

การพัฒนาชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test จากสภาวะที่เหมาะสมแล้วที่ได้ นำมาเตรียมน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ที่สามารถตรวจได้ทั้ง 4 parameters (E-DAT, E-IAT, T-DAT & T-IAT) ในน้ำยาชุดเดียว ซึ่งประกอบด้วย

- 1.) Diluent ได้แก่ 0.1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (0.1% BSA-PBS),
- 2.) Erythrocyte fixative solution ได้แก่ 0.05% glutaraldehyde ใน 0.1%BSA-PBS,
- 3.) Thrombocyte fixative solution ได้แก่ 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS,
- 4.) Secondary antibody ได้แก่ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) และ
- 5.) Fix-for-Flow solution ได้แก่ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS

ทำให้สะดวกมากในการตรวจวัดทั้ง 4 parameters ด้วยชุดน้ำยาตรวจเพียงชุดเดียว เพียงแต่เลือกใช้ ตัวอย่างตรวจ เซลล์เป้าหมาย วิธีการ และการตั้งเครื่อง flow cytometer ที่เหมาะสม เท่านั้น

ความคงตัวของชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ชุดน้ำยาที่เตรียมได้ ที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยทำการตรวจทั้ง E-IAT และ T-IAT ในตัวอย่าง serum ผู้ป่วย AIHA และ AITP ตามลำดับ ที่แยกเป็น aliquats เก็บไว้ใน freezer - 20 °C แล้วนำออกมาละลายทีละ 1 aliquat เพื่อทำการตรวจ เดือนละครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน รวม 6 ครั้ง พบว่า mean $\pm$ standard deviation (S.D.) และ percent coefficient of variation (%CV) ของ mean different MFI ของ serum ผู้ป่วย AIHA 1 ราย ทำ E-IAT 6 replicates แบบ between-run คือ 1.018 ± 0.050 และ 4.945% ตามลำดับ โดยทั้ง 6 ค่า ไม่มีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญ และของ serum ผู้ป่วย AITP 1 ราย ทำ T-IAT 6 replicates แบบ between-run เช่นกัน คือ 1.385 ± 0.176 และ 12.73% ตามลำดับ โดยทั้ง 6 ค่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าชุดน้ำยาที่เตรียมได้ ที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C มีความคงตัว เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 6 เดือน

การเปรียบเทียบค่า flow cytometric และ standard tube test ของ erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ ตัวอย่าง RBC ได้จาก ผู้ป่วย AIHA ($n = 50$), RA ($n = 50$), NAD ($n = 50$) และกลุ่มคนปกติ ($n = 50$) พบว่า ค่า grading of agglutination (GA) ของวิธี standard tube test (STT) E-DAT คือ 1.60 ± 0.67 , 0.12 ± 0.33 , 0.00 ± 0.00 & 0.00 ± 0.00 ตามลำดับ ซึ่งค่า GA ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า GA ในผู้ป่วย RA สูงกว่าอีก 2 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า GA ในผู้ป่วย NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าวิธี STT ของ E-DAT สามารถใช้แยกผู้ป่วย AIHA และ RA ออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ และคนปกติได้ แต่เป็นวิธี STT เป็น subjective ต้องอาศัยความรู้และความชำนาญของผู้อ่านผล ในการให้ GA ทำให้ผลการอ่านไม่แน่นอน จึงมีความน่าเชื่อถือไม่แน่นอน ตามผู้อ่านไปด้วย

สำหรับค่า ค่า MFI โดยวิธี flow cytometry (FC) E-DAT พบว่า ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าวิธี FC ของ E-DAT สามารถใช้แยกผู้ป่วย AIHA ออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่เหลือ และคนปกติได้ รวมทั้งยังเป็นวิธี objective ที่อ่านผลด้วยเครื่อง มีค่า base line คงที่แน่นอน ไม่แปรผันไปตามความรู้ หรือความชำนาญของผู้ที่ทำการตรวจวัด นับจำนวนเซลล์ได้มาก ความน่าเชื่อถือจึงสูงกว่า

การเปรียบเทียบค่า flow cytometric และ standard tube test ของ erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ โดยใช้ตัวอย่าง serum จากผู้ป่วย และคนปกติ ชุดเดียวกันกับ E-DAT พบว่า ค่า GA ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลือ

อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า GA ของวิธี STT ในผู้ป่วย RA สูงกว่าอีก 2 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า GA ในผู้ป่วย NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เหตุผลเช่นเดียวกันกับวิธี STT ของ E-DAT แตกต่างกันเพียง เป็นการตรวจหา auto-antibodies ใน serum ที่สามารถจับกับ normal RBC ได้ เท่านั้นเอง

สำหรับค่า ค่า MFI โดยวิธี flow cytometry (FC) E-IAT พบว่า ในผู้ป่วย AIHA สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เหตุผลเช่นเดียวกันกับ วิธี FC ของ E-DAT แตกต่างกันเพียง เป็นการตรวจหา auto-antibodies ใน serum ที่สามารถจับกับ normal RBC ได้ เท่านั้นเอง

การเปรียบเทียบค่า flow cytometric thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ ตัวอย่าง platelets ได้จาก ผู้ป่วย AITP ($n = 50$), RA ($n = 50$), NAD ($n = 50$) และกลุ่มคนปกติ ($n = 50$) พบว่าค่า MFI ในผู้ป่วย AITP สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าวิธี FC ของ T-DAT สามารถใช้แยกผู้ป่วย AITP ออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่เหลือ และคนปกติได้ รวมทั้งยังเป็นวิธี objective ที่อ่านผลด้วยเครื่อง มีค่า base line คงที่แน่นอน ไม่แปรผันไปตามความรู้ หรือความชำนาญของผู้ที่ทำการตรวจวัด นับจำนวนเซลล์ได้มาก ความน่าเชื่อถือจึงสูงกว่า

การเปรียบเทียบค่า flow cytometric thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT) ในผู้ป่วยกับคนปกติ โดยใช้ตัวอย่าง serum จากผู้ป่วยและคนปกติ ชุดเดียวกันกับ T-DAT พบว่า ค่า MFI ในผู้ป่วย AITP สูงกว่าอีก 3 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยค่า MFI ในผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงว่าวิธี FC T-IAT ก็สามารถแยกผู้ป่วย AITP ออกจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่เหลือ และคนปกติได้ เหตุผลเช่นเดียวกันกับ วิธี FC ของ T-DAT แตกต่างกันเพียง เป็นการตรวจหา auto-antibodies ใน serum ที่สามารถจับกับ normal Plt ได้ เท่านั้นเอง

บทที่ 5

สรุป

ชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ที่เตรียมได้นี้ สามารถตรวจได้ทั้ง 4 parameters (E-DAT, E-IAT, T-DAT & T-IAT) ในน้ำยาชุดเดียว ซึ่งองค์ประกอบของชุดน้ำยา ได้แก่ 1.) Diluent ได้แก่ 0.1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (0.1% BSA-PBS), 2.) Erythrocyte fixative solution ได้แก่ 0.05% glutaraldehyde ใน 0.1%BSA-PBS, 3.) Thrombocyte fixative solution ได้แก่ 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde ใน 0.1% BSA-PBS, 4.) Secondary antibody ได้แก่ F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) และ 5.) Fix-for-Flow solution ได้แก่ 1% formaldehyde ใน 0.1%BSA-PBS

ชุดน้ำยาตรวจเพียงชุดเดียวนี้อาจตรวจวัดได้ทั้ง 4 parameters มีความคงตัวมากกว่า 6 เดือน ทำให้สะดวกและประหยัดมาก เพียงแต่จะต้องเลือกใช้ ตัวอย่างตรวจ เซลล์เป้าหมาย วิธีการ และการตั้งเครื่อง flow cytometer ที่เหมาะสมเท่านั้น

นอกจากนี้ วิธี flow cytometry ยังมีข้อดี เหนือกว่าวิธี standard tube test อีกมากมาย เช่น เป็นวิธี objective ที่อ่านผลด้วยเครื่อง มีค่า base line คงที่แน่นอน ไม่แปรผันไปตามความรู้ หรือความชำนาญของผู้ที่ทำการตรวจวัด นับจำนวนเซลล์ได้มาก ความน่าเชื่อถือจึงสูง

ดังนั้น ชุดน้ำยาตรวจ flow cytometric antiglobulin test ที่เตรียมได้นี้ จึงน่าจะมีโอกาสในการพัฒนาให้มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อมุ่งหวังเป้าหมายในเชิงพาณิชย์ ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Cabiedes J, *et al.* Characterization of anti-phosphatidylcholine polyreactive natural autoantibodies from normal human subjects. *J Autoimmun* 2002; **18** (2): 181-90.
- Christopoulos CG, *et al.* A flow-cytometric approach to quantitative estimation of platelet surface immunoglobulin G. *Vox Sang* 1993; **64** (2): 106-15.
- Fabris F, *et al.* Attempt to improve the diagnosis of immune thrombocytopenia by combined use of two different platelet autoantibodies assays (PAIgG and MACE). *Haematologica* 2002; **87** (10): 1046-52.
- Fischer K, *et al.* Flow cytometry detection of erythrocyte antigens and antibodies. Technical aspects and new clinical applications. *Infusionsther Transfusionsmed* 1995; **22** (6): 344-9.
- Gutting BW, *et al.* Diclofenac activates T cells in the direct popliteal lymph node assay and selectively induces IgG(1) and IgE against co-injected TNP-OVA. *Toxicol Lett* 2002; **131** (3): 167-80.
- Hagenstrappm H, *et al.* Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2000; **84** (5): 779-83.
- Heim MC, *et al.* Detection of platelet-associated immunoglobulin in immune thrombocytopenia by flow cytometry. *Diagn Clin Immunol* 1988; **5** (6): 309-13.

Holme S, *et al.* Increased levels of platelet associated IgG in patients with thrombocytopenia are not confined to any particular size class of platelets.

Br J Haematol 1988; **68** (4): 431-6.

Iwase O, *et al.* Analysis of T cell subsets in autoimmune hemolytic anemia patients.

Rinsho Ketsueki 1995; **36** (1): 1-5.

Kerr R, *et al.* Direct antiglobulin test negative, non spherocytic autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 2000; **22** (6): 365-7.

Lin JS, *et al.* Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion* 2009; **49** (7): 1335-46. (Epub 2009 Mar 20.)

Lynen R, *et al.* Flow cytometry analysis of IGG subclasses of auto- and alloantibodies in autoimmune hemolytic anemia and hemolytic disease of the newborn. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1994; **32**: 203-7.

Rajendra C, *et al.* Application of flow cytometry in detection of red cell bound IgG in Coombs negative AIHA. *Hematology* 2006; **11** (4): 295-300.

Rinder HM, *et al.* Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993; **117** (6): 606-10.

Romero-GuzmAn LT, *et al.* Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica* 2000; **85** (6): 627-31.

Rosenfeld CS, *et al.* Flow cytometric measurement of antiplatelet antibodies. *Am J Clin Pathol* 1987; **87** (4): 518-22.

Shnaider A, *et al.* Severe Coomb-negative autoimmune hemolytic anemia in a kidney transplant patient. *Am J Nephrol* 2002; **21** (6): 494-7.

Tomer A, *et al.* Antiphospholipid antibody syndrome: rapid, sensitive, and specific flow cytometric assay for determination of anti-platelet phospholipid autoantibodies. *J Lab Clin Med* 2002; **139** (3): 147-54.

Wang Z, *et al.* Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2001; **73** (2): 188-93.

Zeiler T, *et al.* Flow cytometric determination of RBC survival in autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 2001; **41** (4): 493-8.

ผลิตผลจากโครงการวิจัย

1. การเข้าร่วมประชุมวิชาการเพื่อเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการจำนวน 2 ครั้ง คือ
 - 1.1. Abstract 1: Munde Y, Srihirunrat R, Charoenkwan P, Fongsatitkul L, Pattanapanyasat K. Flow cytometric antiglobulin test for detection of auto-antibodies on erythrocytes and thrombocytes. Poster presentation at The Thailand research Fund (TRF) Meeting for Young Researchers to Meet Senior Researchers. January 14 - 16, 2005. Kanchanaburi, Thailand.
 - 1.2. Abstract 2: Munde Y, Srihirunrat R, Charoenkwan P, Fongsatitkul L, Pattanapanyasat K. Diagnosis of auto-immune hemolytic anemia by flow cytometric antiglobulin test. Oral presentation at The Thailand research Fund (TRF) Meeting for Young Researchers to Meet Senior Researchers. October 13 - 15, 2005. Cha-am, Petchaburi, Thailand.
2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
 - 2.1. Manuscript 1: Munde Y, Srihirunrat R, Charoenkwan P, Fongsatitkul L, Pattanapanyasat K. Flow cytometric antiglobulin test for detection of auto-antibodies on erythrocytes and in serum for diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. Submitted to The Open Hematology Journal on November 16, 2009.
 - 2.2. Manuscript 2: Munde Y, Srihirunrat R, Charoenkwan P, Fongsatitkul L, Pattanapanyasat K. Flow cytometric antiglobulin test for detection of auto-antibodies on thrombocytes and in serum for diagnosis of autoimmune thrombocytopenia purpura. Submitted to International Journal of Hematology on November 16, 2009.

APPENDECES

Abstract 1:

FLOW CYTOMETRIC ANTIGLOBULIN TEST FOR DETECTION OF AUTO-ANTIBODIES ON ERYTHROCYTES AND THROMBOCYTES

Yuttana Munde^{a*}, Ratchaneewan Srihirunrat^a, Pimlak Charoenkwan^b, Ladda
Fongsatitkul^c, Kovit Pattanapanyasat^d.

^a*Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai
University 50200, Thailand.*

^b*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.*

^c*Blood Bank Section, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.*

^d*Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol
University, Bangkok 10700, Thailand.*

Abstract—Flow cytometry (FC) is a modern technique for enumeration of free cells or particles suspended in fluid and flowing through a beam of laser singularly. Some properties of the cells such as size and granularity can be measured directly on unstained cells. While the others such as surface and cytoplasmic markers must be stained with fluorescence or immuno-fluorescence. Due to the advancement of fluorescent technology, there are varieties of dyes available in the market, both for direct staining and conjugated to polyclonal and monoclonal antibody for immuno-staining. The technique has advanced advantages over light and fluorescent microscopy such as higher number of cell counted, shorter time used, objective measurement and therefore more reliability. Antiglobulin test (AGT) is a test of choice for demonstration of

antibodies on erythrocyte surface and in the plasma or serum. The tests both direct and indirect (DAT & IAT) are highly benefit in diagnosis and follow up of auto-immune hemolytic anemia (AIHA), transfusion reaction, hemolytic disease of the newborn and evaluation of minor blood group and pre-transfusion testing (compatibility test or cross matching). Apart from erythrocyte, thrombocyte auto-immune disorder such as auto-immune thrombocytopenic purpura (AITP) is of interest whether DAT and IAT can be applied. Because of the small size, thrombocyte DAT and IAT accompany with agglutination test are not easy. However FC has no objection on the size of both cells. We describe here is a simple flow cytometric antiglobulin procedure for detection of auto-antibodies on erythrocytes and thrombocytes. The procedure covers erythrocyte and thrombocyte for both DAT and IAT. Seeking for optimal conditions for these procedures are the objectives. Clotted and anti-coagulated blood samples from patients with AIHA and AITP and normal healthy control blood donor were obtained from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. For erythrocyte indirect and direct antiglobulin tests (E-IAT & E-DAT), the optimal conditions seeking for were incubation 1 between 5% red cell suspension and serum at the ratio of 1:2 at 37, 25 & 4 °C for 20, 40 & 60 min; volume of anti-human-globulin conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC) used at 8, 4, 2, 1 & 0.5 µL and incubation 2 between 0.5% sensitized red cell suspension and FITC conjugate at 37, 25 & 4 °C for 15, 30 & 45 min. The optimal conditions were at 37°C for 15 min of incubation 1; 4 µL of conjugate used and 25°C for 20 min of incubation 2. For thrombocyte indirect and direct antiglobulin tests (T-IAT & T-DAT), the seeking conditions were as same as the erythrocyte procedure but 106 platelets per reaction were used instead of 5% red cell

suspension. The optimal conditions were both 4 and 37°C for incubation 1 and the rest were as same as the erythrocyte procedure. These optimal conditions gave a satisfied discrimination between patient and control samples. In addition, the 4 parameters can be drawn from a single reagent kit. Since all 4 procedures require the same reagents. The clinical application of these 4 parameters is in progress for patients with AIHA, AITP, rheumatoid arthritis, anemia and normal healthy control blood donors.

Keywords—Flow cytometry, Antiglobulin test, Auto-antibody, Erythrocyte, Thrombocyte.

* Corresponding author. Tel.: 66-53-945078 ext. 22; fax: 66-53-946042;

e-mail: yuttana@chiangmai.ac.th

Abstract 2:**DIAGNOSIS OF AUTO-IMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA BY FLOW CYTOMETRIC ANTIGLOBULIN TEST**

Yuttana Munde^{a*}, Ratchaneewan Srihirunrat^a, Pimlak Charoenkwan^b, Ladda

Fongsatitkul^c, Kovit Pattanapanyasat^d.

^a*Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai*

University 50200, Thailand.

^b*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.*

^c*Blood Bank Section, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.*

^d*Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol*

University, Bangkok 10700, Thailand.

Abstract—Auto-immune hemolytic anemia (AIHA) and auto-immune thrombocytopenic purpura (AITP) are organ specific autoimmune diseases. Defect of immune system that can not recognize self-antigens are the etiology. Patients with AIHA and AITP produce auto-antibodies against their own erythrocytes and thrombocytes respectively. Classical diagnostic test for AIHA is anti-globulin or Coomb's test (AT or CT). The test can be done by standard agglutination test in the test tube, which is not sensitive, less specific and limited reliable. While the test for AITP is just platelet count, which has a similar problem. However AT is a test of choice to demonstrate antibodies on cell surface (direct AT) and in the plasma or serum (indirect AT). Either erythrocytes or thrombocytes can be tested for both DAT and IAT. In case of erythrocyte, the tests can be called erythrocyte-DAT and erythrocyte-IAT (E-DAT & E-IAT respectively). While the tests for thrombocytes can be called thrombocyte-DAT and thrombocyte-IAT (T-DAT &

T-IAT). These tests can be examined easily by flow cytometry (FC), which is a modern technique for enumeration of free cells or particles suspended in fluid and flowing through a beam of laser singularly. These tests are very highly benefited in diagnoses and follow up of AIHA and AITP. We used a simple flow cytometric antiglobulin procedure to detect auto-antibodies on erythrocytes and thrombocytes for both direct and indirect procedures (E-DAT, E-IAT, T-DAT & T-IAT respectively). Clotted or anti-coagulated blood samples from patients with AIHA (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 43), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and from normal blood donor (Normal, n = 50) were obtained from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, between January 2004 to June 2005. Unfortunately we could not obtain any AITP blood sample. Procedure for E-IAT was as follows. One hundred μL of 0.5% RBC suspension was incubated with 200 μL of serum or plasma at 37°C for 30 min, and then washed 3 times. Five μL of anti-human globulin conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC) was added and then incubated at room temperature (RT) for 30 min and then washed 3 times. Procedure for E-DAT was as follows. The RBC was washed 3 times and then followed by the second incubation as in E-IAT onward. Procedures for T-IAT and T-DAT were similar to those of erythrocytes but using platelet suspension instead of RBC suspension. The entire pellet was resuspended with 0.5 mL of 1% formaldehyde in PBS before flow cytometry. Beckman-Coulter Epic-XL (USA) flow cytometer was used with 530 nm, side- and forward-scatter detectors. The mean fluorescent intensity (MFI) of E-DAT & E-IAT of patients with AIHA were significantly higher than those of RA, NAD and Normal ($p < 0.05$). While the MFI of T-DAT & T-IAT of RA, NAD and Normal were not significantly different. These results shows that flow

cytometric antiglobulin test can be applied for the diagnosis of AIHA because the MFI of the patients were higher than those of the other group. Apart from that flow cytometric antiglobulin procedure describing here can possibly be applied for transfusion reaction, hemolytic disease of the newborn and blood group determination and pre-transfusion testing (compatibility test or cross matching).

Keywords— AIHA, AITP, Flow cytometry, Antiglobulin test, Auto-antibody.

* Corresponding author. Tel.: 66-53-945078 ext. 22; fax: 66-53-946042;

e-mail: yuttana@chiangmai.ac.th

Manuscript 1: Submitted to The Open Hematology Journal

**FLOW CYTOMETRIC ANTIGLOBULIN TEST FOR DETECTION OF AUTO-
ANTIBODIES ON ERYTHROCYTES AND IN SERUM FOR DIAGNOSIS OF
AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA**

Yuttana Munde^{a*}, Ratchaneewan Srihirunrat^a, Pimlak Charoenkwan^b,
Ladda Fongsatitkul^c, Kovit Pattanapanyasat^d.

^aDepartment of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang
Mai University 50200, Thailand.

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^cBlood Bank Section, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^dOffice of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol
University, Bangkok 10700, Thailand.

Abstract

Flow cytometry (FC) is a modern technique for enumeration of free cells or particles that suspended in fluid during flowing through a beam of laser in a cell by cell manner. The technique has superior advantages over fluorescent microscopy such as higher number of counted cells, shorter time consuming, objective measurement and more reliability. Antiglobulin test (AGT) is a test of choice for demonstration of antibodies on erythrocyte surface called erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT) and antibodies in serum called erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT). Both E-DAT and E-IAT are highly benefited on diagnosis and follow up of auto-immune hemolytic anemia (AIHA). Both DAT and IAT can be modified to be measured by flow cytometry using

erythrocytes as target particles. We developed a simple flow cytometric antiglobulin procedure for determination of auto-antibodies on erythrocytes and in the serum. The optimal conditions were as follows. Five percent erythrocyte suspension was incubated with serum at the ratio of 1:2 at 37°C for 30 min then the cells were washed 3 times with 1% bovine serum albumin in phosphate buffer saline (1% BSA-PBS). After that, F(ab')₂ anti-human globulin conjugated fluorescein isothiocyanate (AHG-FITC) was added. The suspension was then mixed and incubated at room temperature (RT) for 30 min in the dark. Finally 500 µL of 1% formaldehyde in 1% BSA-PBS was added. The suspension was ready to be measured by flow cytometer. These optimal conditions gave a satisfied discrimination between mean fluorescent intensity (MFI) obtaining from patients and from normal healthy control sera. Flow cytometry of E-DAT and E-IAT were tested on blood samples from patients with AIHA (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 50), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and normal healthy blood donor (Normal, n = 50). The mean fluorescent intensity (MFI) of E-DAT was 1.88 ± 0.66 , 0.60 ± 0.35 , 0.42 ± 0.23 & 0.45 ± 0.23 and of E-IAT were 2.24 ± 5.95 , 0.68 ± 0.34 , 0.59 ± 0.20 & 0.67 ± 0.18 respectively. The MFI of E-DAT & E-IAT in patients with AIHA were significantly higher than those of RA, NAD and Normal ($p < 0.05$). While the MFI of E-DAT & E-IAT of RA, NAD and Normal were not significantly different. The developed flow cytometric antiglobulin for detection of auto-antibodies on erythrocytes and in serum can be used for diagnosis of AIHA. Since the MFI of AIHA patients were higher than those of the other group.

Keywords Flow cytometry, Antiglobulin test, Auto-immune hemolytic anemia, Erythrocyte.

Introduction

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a type of hemolytic anemia where the body's immune system attacks its own red blood cells (RBCs), leading to their destruction (hemolysis).[1][2][3] AIHA can also be induced by several drugs including methyl dopa and fludarabine. Types of AIHA include Warm autoimmune hemolytic anemia, Cold agglutinin disease, and Paroxysmal cold hemoglobinuria. Antibodies and associated complement system components become fixed onto the RBC surface. These antibodies can be detected with the direct antiglobulin test, also known as the direct Coombs test. The two Coombs tests are the direct Coombs test (also known as direct antiglobulin test or DAT), and the indirect Coombs test (also known as indirect antiglobulin test or IAT). In certain diseases or conditions an individual's blood may contain IgG antibodies that can specifically bind to antigens on the red blood cell (RBC) surface membrane, and their circulating red blood cells (RBCs) can become coated with IgG alloantibodies and/or IgG autoantibodies. Complement proteins may subsequently bind to the bound antibodies. The direct Coombs test is used to detect these antibodies or complement proteins that are bound to the surface of red blood cells; a blood sample is taken and the RBCs are washed (removing the patient's own plasma) and then incubated with antihuman globulin (also known as "Coombs reagent"). If this produces agglutination of RBCs, the direct Coombs test is positive, a visual indication that antibodies (and/or complement proteins) are bound to the surface of red blood cells. The indirect Coombs test is used to detect antibodies against RBCs that are present unbound in the patient's serum. In this case, serum is extracted from the blood, and the

serum is incubated with RBCs of known antigenicity. If agglutination occurs, the indirect Coombs test is positive.[4]

Flow cytometry is a technique for counting and examining individual properties of microscopic particles or cells. The cells are suspended in fluid and pressing them to be a stream to pass through a laser beam then scattered light and fluorescence can be detected on electronic apparatus. It allows simultaneous multiparametric analysis of the physical and/or chemical characteristics of up to thousands of particles per second. Flow cytometry is routinely used in the diagnosis of health disorders, especially blood diseases.[5]

Reading of agglutination of antiglobulin test using standard tube test are subjective and unstable reliability. Flow cytometry can be applied for both DAT and IAT. Antihuman globulin conjugated fluorescent dye is used instead of antihuman globulin alone. Flow cytometric antiglobulin test is more reliable due to its objectives, higher number of counted cells. We propose here a procedure of flow cytometric antiglobulin test for detection of autoantibodies on erythrocytes and in serum for diagnosis of AIHA.

Materials and methods

Blood samples

Clotted blood samples from patients with AIHA (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 43), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and from normal blood donor (Normal, n = 50) were obtained from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Serum was separated and kept at -20 °C until

analysis. Erythrocytes were separated and then analysis within the 2 days after collection. All subjects were signed consent for participation in this research.

Standard tube test of antiglobulin test (STT)

Direct antiglobulin test (DAT): Fifty μL packed RBC was diluted with 950 μL PBS to be 5% RBC suspension in PBS. Twenty five μL of 5% RBC suspension was washed 3 times with PBS. The supernatant was drained with absorbed paper. One hundred 100 μL of polyspecific anti-human globulin serum (AHG) was added. These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded. In case of negative, 50 μL of 5% Coomb's control cells (CCC) was added. These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded.

Indirect antiglobulin test (IAT): Fifty μL of test serum was reacted with 25 μL of 5% RBC suspension and was incubated for 5 min at room temperature (RT). These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded. After that the cells and serum were incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded. The cells were washed 3 times with PBS. The supernatant was drained with absorbed paper. One hundred 100 μL of polyspecific anti-human globulin serum (AHG) was added. These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded. In case of negative, 50 μL of 5% Coomb's control cells (CCC) was added. These were then centrifuge for 15 sec. Agglutination was readed and recorded

Flow cytometry of antiglobulin test

Erythrocyte direct antiglobulin test (E-DAT): Twenty five μL of 5% RBC suspension was washed 3 times with 0.1% BSA-PBS. The supernatant was drained

with absorbed paper. Two hundred and fifty μL of 0.1% BSA-PBS was added to be 0.5 % washed RBC suspension. Seventy five μL of 0.5 % washed RBC suspension was reacted with 75 μL of 1:10 diluted F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) for 30 min in the dark at RT. After that 500 μL of 1% formaldehyde in 0.1%BSA-PBS was added. The cells were then ready to be analyzed with flow cytometry. The machine was set to stop at 50,000 cells with log side scatter, log forward scatter and log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence at 530 nm) opening. Mean fluorescent intensity (MFI) was recorded and compared with normal control.

Erythrocyte indirect antiglobulin test (E-IAT): Twenty five μL of glutaraldehyde fix-washed 0.5% RBC suspension obtaining from the Thai Red Cross Society was reacted with 50 μL of undiluted test serum. These were incubated at 37 °C for 30 min. After that the cells were washed 3 times with 0.1% BSA-PBS. The supernatant was drained with absorbed paper. These were then reacted with 75 μL of 1:10 diluted AGT-FITC in the dark at RT for 30 min. After that 500 μL of 1% formaldehyde in 0.1%BSA-PBS was added. The cells were then ready to be analyzed with flow cytometry. The machine was set to stop at 50,000 cells with log side scatter, log forward scatter and log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence at 530 nm) opening. Mean fluorescent intensity (MFI) was recorded and compared with normal control.

Representative flow cytometric histograms of both direct and indirect antiglobulin test were shown in figure 1.

Results

The mean $\pm$ S.D. of grading of agglutination (GA:- 4+, 3+, 2+, 1+ & 0) of E-DAT using standard tube test (STT) in AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 1.60 ± 0.67 , 0.12 ± 0.33 , 0.00 ± 0.00 & 0.00 ± 0.00 , respectively. Grading of agglutination in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). Grading of agglutination in RA was also significantly higher than the rest 2 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 2.

The mean $\pm$ S.D. of mean fluorescent intensity (MFI) of E-DAT using flow cytometry (FC) in AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 1.88 ± 0.66 , 0.60 ± 0.35 , 0.42 ± 0.23 & 0.45 ± 0.23 , respectively. Mean fluorescent intensity in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 3.

The mean $\pm$ S.D. of GA of E-IAT using standard tube test (STT) in AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 0.76 ± 0.62 , 0.08 ± 0.27 , 0.00 ± 0.00 & 0.00 ± 0.00 , respectively. Grading of agglutination in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). Grading of agglutination in RA was also significantly higher than the rest 2 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 4.

The mean $\pm$ S.D. of MFI of E-IAT using flow cytometry (FC) in AIHA (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 2.24 ± 5.95 , 0.68 ± 0.34 , 0.59 ± 0.20 & 0.67 ± 0.18 , respectively. Mean fluorescent intensity in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 5.

Discussion

The developed flow cytometric antiglobulin for detection of auto-antibodies on erythrocytes and in serum can be used for diagnosis of AIHA. Since the MFI of AIHA patients were higher than those of the other group. Apart from that flow cytometric antiglobulin procedure describing here can possibly be applied for transfusion reaction, hemolytic disease of the newborn and blood group determination and pre-transfusion testing (compatibility test or cross matching).

References

1. Autoimmune hemolytic anemia at Mount Sinai Hospital (Retrieved 2009-11-16)
2. "Hemolytic Anemia: Overview - eMedicine Hematology".
<http://emedicine.medscape.com/article/201066-overview>. (Retrieved 2009-02-07)
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Autoimmune_hemolytic_anemia (Retrieved 2009-11-16)
4. F. Rosen and R. Geha, Case Studies in Immunology, 4th ed., Garland Science, p.173. (Retrieved 2009-11-16)
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry (Retrieved 2009-11-16)
6. Fischer K, *et al.* Flow cytometry detection of erythrocyte antigens and antibodies. Technical aspects and new clinical applications. *Infusionsther Transfusionsmed* 1995; 22 (6): 344-9.
7. Iwase O, *et al.* Analysis of T cell subsets in autoimmune hemolytic anemia patients. *Rinsho Ketsueki* 1995; 36 (1): 1-5.

8. Kerr R, *et al.* Direct antiglobulin test negative, non spherocytic autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 2000; 22 (6): 365-7.
9. Lin JS, *et al.* Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion* 2009; 49 (7): 1335-46. (Epub 2009 Mar 20.)
10. Lynen R, *et al.* Flow cytometry analysis of IGG subclasses of auto- and alloantibodies in autoimmune hemolytic anemia and hemolytic disease of the newborn. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1994; 32: 203-7.
11. Rajendra C, *et al.* Application of flow cytometry in detection of red cell bound IgG in Coombs negative AIHA. *Hematology* 2006; 11 (4): 295-300.
12. Shnaider A, *et al.* Severe Coomb-negative autoimmune hemolytic anemia in a kidney transplant patient. *Am J Nephrol* 2002; 21 (6): 494-7.
13. Wang Z, *et al.* Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2001; 73 (2): 188-93.
14. Zeiler T, *et al.* Flow cytometric determination of RBC survival in autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 2001; 41 (4): 493-8.

Figures

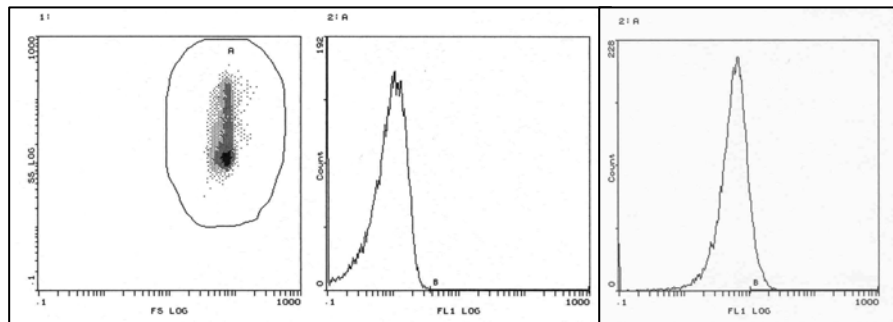


Figure 1 Flow Cytometric Histogram of Erythrocyte Antiglobulin Test

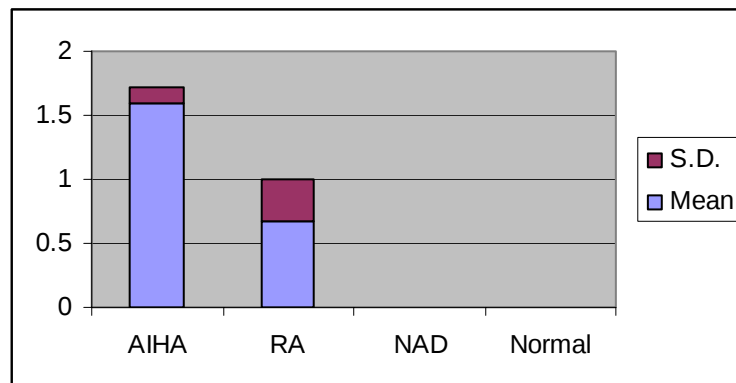


Figure 2 Grading of Agglutination of Erythrocyte Direct Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rhumatiod arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Grading of agglutination in AIHA was significantly higher than RA, NAD & Normal ($p < 0.05$) and GA in RA was significantly higher than NAD & Normal ($p < 0.05$).

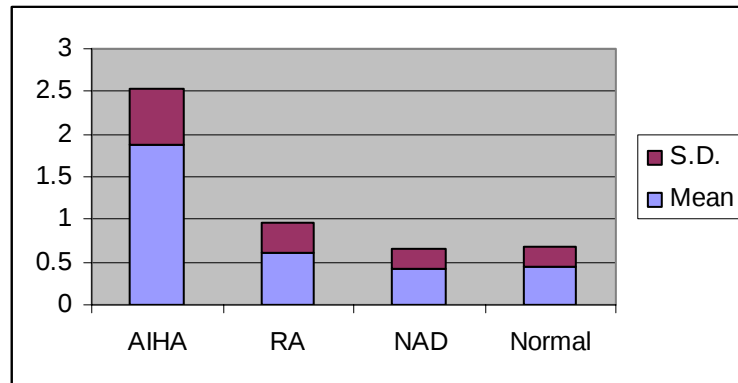


Figure 3 Mean Fluorescent Intensity of Erythrocyte Direct Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Mean fluorescent intensity in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$).

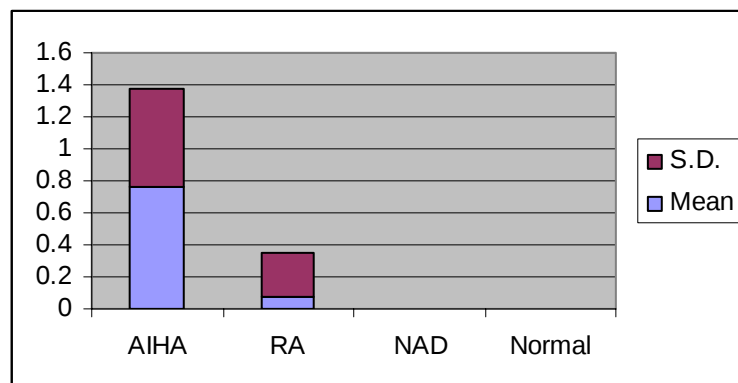


Figure 4 Grading of Agglutination of Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Grading of agglutination in AIHA was significantly higher than RA, NAD & Normal ($p < 0.05$) and GA in RA was significantly higher than NAD & Normal ($p < 0.05$).

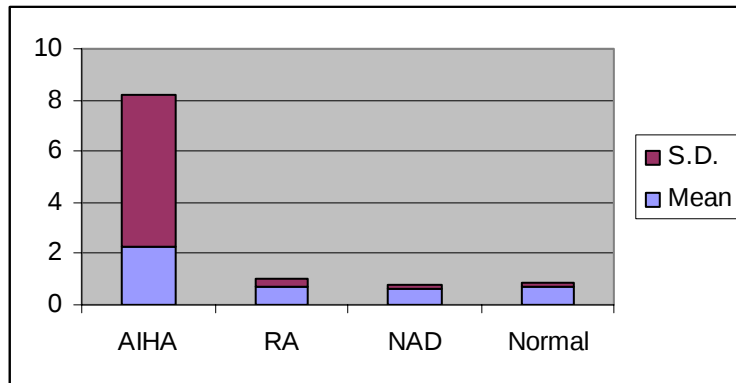


Figure 5 Mean Fluorescent Intensity of Erythrocyte Indirect Antiglobulin Test

AIHA = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Mean fluorescent intensity in AIHA was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$).

Manuscript 2: Submitted to International Journal of Hematology

**FLOW CYTOMETRIC ANTIGLOBULIN TEST FOR DETECTION OF AUTO-
ANTIBODIES ON THROMBOCYTES AND IN SERUM FOR DIAGNOSIS OF
AUTOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA PURPURA**

Yuttana Munde^{a*}, Ratchaneewan Srihirunrat^a, Pimlak Charoenkwan^b,
Ladda Fongsatitkul^c, Kovit Pattanapanyasat^d.

^aDepartment of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang
Mai University 50200, Thailand.

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^cBlood Bank Section, Faculty of Medicine, Chiang Mai University 50200, Thailand.

^dOffice of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol
University, Bangkok 10700, Thailand.

Abstract

Flow cytometry (FC) is a modern technique for enumeration of free cells or particles that suspended in fluid during flowing through a beam of laser in a cell by cell manner. The technique has superior advantages over fluorescent microscopy such as higher number of counted cells, shorter time consuming, objective measurement and more reliability. Antiglobulin test (AGT) has a potential to be used for demonstration of antibodies on thrombocyte surface called thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT) and antibodies in serum called thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT). Both T-DAT and T-IAT are highly benefited on diagnosis and follow up of auto-immune thrombocytopenia purpura (AITP). Both DAT and IAT can be modified to be measured

by flow cytometry using thrombocytes as target particles. We developed a simple flow cytometric antiglobulin procedure for determination of auto-antibodies on thrombocytes and in the serum. The optimal conditions were as follows. Five percent thrombocyte suspension was incubated with serum at the ratio of 1:2 at 37°C for 30 min then the cells were washed 3 times with 1% bovine serum albumin in phosphate buffer saline (1% BSA-PBS). After that, F(ab')₂ anti-human globulin conjugated fluorescein isothiocyanate (AHG-FITC) was added. The suspension was then mixed and incubated at room temperature (RT) for 30 min in the dark. Finally 500 µL of 1% formaldehyde in 1% BSA-PBS was added. The suspension was ready to be measured by flow cytometer. These optimal conditions gave a satisfied discrimination between mean fluorescent intensity (MFI) obtaining from patients and from normal healthy control sera. Flow cytometry of T-DAT and T-IAT were tested on blood samples from patients with AITP (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 50), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and normal healthy blood donor (Normal, n = 50). The mean fluorescent intensity (MFI) of T-DAT was 2.31 ± 0.81 , 0.84 ± 0.63 , 0.65 ± 0.16 & 0.54 ± 0.16 and of T-IAT were 1.36 ± 0.68 , 0.68 ± 0.23 , 0.54 ± 0.15 & 0.54 ± 0.16 respectively. The MFI of T-DAT & T-IAT in patients with AITP were significantly higher than those of RA, NAD and Normal ($p < 0.05$). While the MFI of T-DAT & T-IAT of RA, NAD and Normal were not significantly different. The developed flow cytometric antiglobulin for detection of auto-antibodies on erythrocytes and in serum can be used for diagnosis of AITP. Since the MFI of AITP patients were higher than those of the other group.

Keywords Flow cytometry, Antiglobulin test, Auto-immune thrombocytopenia purpura, Thrombocyte.

Introduction

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the condition of having a low platelet count (thrombocytopenia) of no known cause (idiopathic).[1] As most causes appear to be related to antibodies against platelets. ITP is also known as autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) or immune-mediated thrombocytopenic purpura. ITP is usually asymptomatic. However a very low platelet count can lead to visible symptoms, such as purpura (bruises), or more seriously, bleeding diathesis. In many cases, ITP's cause is not idiopathic but autoimmune,[2] with antibodies against platelets being detected in approximately 60 percent of patients. Most often these antibodies are against platelet membrane glycoproteins IIb-IIIa or Ib-IX, and are of the IgG type. The coating of platelets with IgG renders them susceptible to opsonization and phagocytosis by splenic macrophages. These antibodies can be detected with the direct antiglobulin test, also known as the direct Coombs test. The two Coombs tests are the direct Coombs test (also known as direct antiglobulin test or DAT), and the indirect Coombs test (also known as indirect antiglobulin test or IAT). In ITP the patient blood may contain IgG autoantibodies that can specifically bind to antigens on the platelet (Plt) or thrombocyte membrane. Complement proteins may subsequently bind to the bound antibodies. The direct Coombs test is used to detect these antibodies or complement proteins that are bound to the surface of thrombocytes; a blood sample is taken and the thrombocytes are washed (removing the patient's own plasma) and then incubated with antihuman globulin (also known as "Coombs reagent"). If this produces agglutination of thrombocytes, the direct Coombs test is positive, a visual indication that antibodies (and/or complement proteins) are bound to the surface of thrombocytes. The indirect

Coombs test is used to detect antibodies against thrombocytes that are present unbound in the patient's serum. In this case, serum is extracted from the blood, and the serum is incubated with thrombocytes of known antigenicity. If agglutination occurs, the indirect Coombs test is positive.[3]

Flow cytometry is a technique for counting and examining individual properties of microscopic particles or cells. The cells are suspended in fluid and pressing them to be a stream to pass through a laser beam then scattered light and fluorescence can be detected on electronic apparatus. It allows simultaneous multiparametric analysis of the physical and/or chemical characteristics of up to thousands of particles per second. Flow cytometry is routinely used in the diagnosis of health disorders, especially blood diseases.[4]

Reading of agglutination of antiglobulin test using standard tube test are subjective and unstable reliability. Flow cytometry can be applied for both DAT and IAT. Antihuman globulin conjugated fluorescent dye is used instead of antihuman globulin alone. Flow cytometric antiglobulin test is more reliable due to its objectives, higher number of counted cells. We propose here a procedure of flow cytometric antiglobulin test for detection of autoantibodies on thrombocytes and in serum for diagnosis of AITP.

Materials and methods

Blood samples

Clotted blood samples from patients with AITP (n = 50), rheumatoid arthritis (RA, n = 43), non-autoimmune diseases (NAD, n = 50) and from normal blood donor (Normal, n = 50) were obtained from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of

Medicine, Chiang Mai University. Serum was separated and kept at -20°C until analysis. Thrombocytes were separated and then analysis within the 2 days after collection. All subjects were signed consent for participation in this research.

Flow cytometry of antiglobulin test

Thrombocyte direct antiglobulin test (T-DAT): Twenty five μL of 5% Plt suspension was washed 3 times with 0.1% BSA-PBS. The supernatant was drained with absorbed paper. Two hundred and fifty μL of 0.1% BSA-PBS was added to be 0.5 % washed Plt suspension. Seventy five μL of 0.5 % washed Plt suspension was reacted with 75 μL of 1:10 diluted F(ab)'2 goat anti-human Igs (polyspecific) conjugated FITC (AGT-FITC) for 30 min in the dark at RT. After that 500 μL of 1% formaldehyde in 0.1%BSA-PBS was added. The thrombocytes were then ready to be analyzed with flow cytometry. The machine was set to stop at 50,000 cells with log side scatter, log forward scatter and log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence at 530 nm) opening. Mean fluorescent intensity (MFI) was recorded and compared with normal control.

Thrombocyte indirect antiglobulin test (T-IAT): Twenty five μL of 0.2% glyoxal 0.4% paraformaldehyde fix-washed 0.5% Plt suspension obtaining from the Thai Red Cross Society was reacted with 50 μL of undiluted test serum. These were incubated at 37°C for 30 min. After that the thrombocytes were washed 3 times with 0.1% BSA-PBS. The supernatant was drained with absorbed paper. These were then reacted with 75 μL of 1:10 diluted AGT-FITC in the dark at RT for 30 min. After that 500 μL of 1% formaldehyde in 0.1%BSA-PBS was added. The cells were then ready to be analyzed with flow cytometry. The machine was set to stop at 50,000 cells with log side scatter,

log forward scatter and log fluorescent detector 1 (LogFL1, green fluorescence at 530 nm) opening. Mean fluorescent intensity (MFI) was recorded and compared with normal control.

Representative flow cytometric histograms of both direct and indirect antiglobulin test were shown in figure 1.

Results

The mean $\pm$ S.D. of mean fluorescent intensity (MFI) of T-DAT using flow cytometry (FC) in AITP (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 2.31 ± 0.81 , 0.84 ± 0.63 , 0.65 ± 0.16 & 0.54 ± 0.16 , respectively. Mean fluorescent intensity in AITP was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 2.

The mean $\pm$ S.D. of MFI of E-IAT using flow cytometry (FC) in AITP (n = 50), RA (n = 50), NAD (n = 50) and normal control subjects (n = 50) were 1.36 ± 0.68 , 0.68 ± 0.23 , 0.54 ± 0.15 & 0.54 ± 0.16 , respectively. Mean fluorescent intensity in AITP was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$). These were shown of figure 3.

Discussion

The developed flow cytometric antiglobulin for detection of auto-antibodies on thrombocytes and in serum can be used for diagnosis of AITP. Since the MFI of AITP patients were higher than those of the other group. Apart from that flow cytometric antiglobulin procedure describing here can possibly be applied for transfusion reaction,

hemolytic disease of the newborn and blood group determination and pre-transfusion testing (compatibility test or cross matching).

References

1. Idiopathic thrombocytopenic purpura at Dorland's Medical Dictionary (Retrived 2009-11-16)
2. Coopamah M, Garvey M, Freedman J, Semple J (2003). "Cellular immune mechanisms in autoimmune thrombocytopenic purpura: An update". *Transfus Med Rev* 17 (1): 69–80. (Retrieved 2009-02-07)
3. F. Rosen and R. Geha, Case Studies in Immunology, 4th ed., Garland Science, p.173. (Retrived 2009-11-16)
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry (Retrived 2009-11-16)
5. Cabiedes J, *et al.* Characterization of anti-phosphatidylcholine polyreactive natural autoantibodies from normal human subjects. *J Autoimmun* 2002; 18 (2): 181-90.
6. Christopoulos CG, *et al.* A flow-cytometric approach to quantitative estimation of platelet surface immunoglobulin G. *Vox Sang* 1993; 64 (2): 106-15.
7. Fabris F, *et al.* Attempt to improve the diagnosis of immune thrombocytopenia by combined use of two different platelet autoantibodies assays (PAIgG and MACE). *Haematologica* 2002; 87 (10): 1046-52.

8. Hagenström H, *et al.* Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2000; 84 (5): 779-83.
9. Heim MC, *et al.* Detection of platelet-associated immunoglobulin in immune thrombocytopenia by flow cytometry. *Diagn Clin Immunol* 1988; 5 (6): 309-13.
10. Holme S, *et al.* Increased levels of platelet associated IgG in patients with thrombocytopenia are not confined to any particular size class of platelets. *Br J Haematol* 1988; 68 (4): 431-6.
11. Lin JS, *et al.* Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion* 2009; 49 (7): 1335-46. (Epub 2009 Mar 20.)
12. Romero-Guzmán LT, *et al.* Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica* 2000; 85 (6): 627-31.
13. Rinder HM, *et al.* Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117 (6): 606-10.
14. Rosenfeld CS, *et al.* Flow cytometric measurement of antiplatelet antibodies. *Am J Clin Pathol* 1987; 87 (4): 518-22.
15. Tomer A, *et al.* Antiphospholipid antibody syndrome: rapid, sensitive, and specific flow cytometric assay for determination of anti-platelet phospholipid autoantibodies. *J Lab Clin Med* 2002; 139 (3): 147-54.

Figures

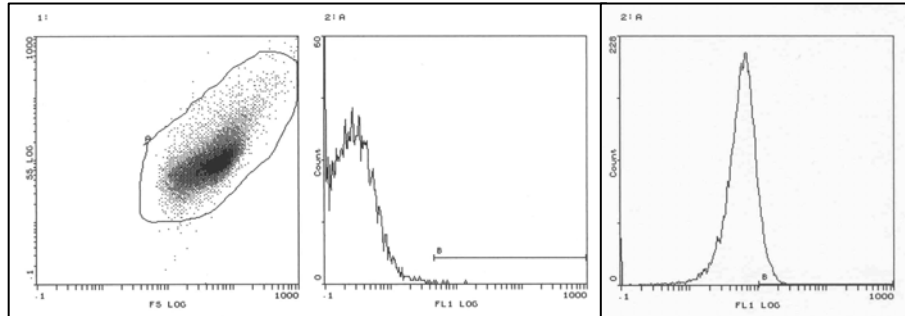


Figure 1 Flow Cytometric Histogram of Thrombocyte Antiglobulin Test

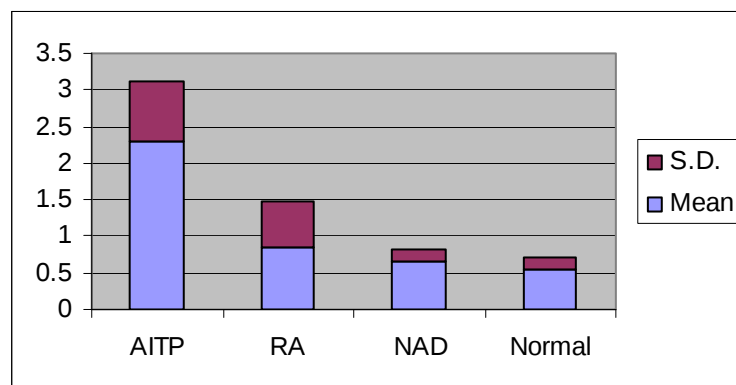


Figure 2 Mean Fluorescent Intensity of Thrombocyte Direct Antiglobulin Test

AITP = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Mean fluorescent intensity in AITP was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$).

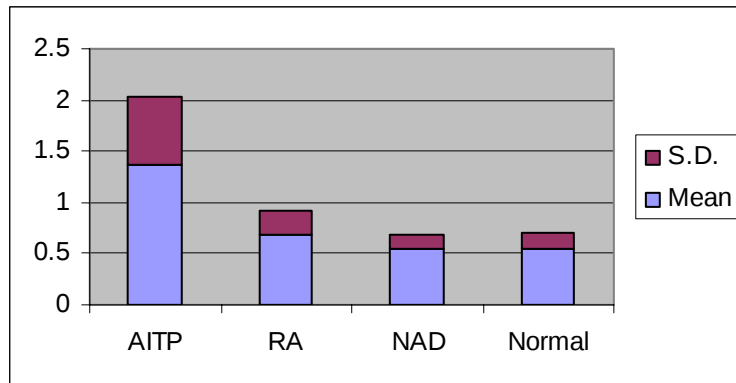


Figure 3 Mean Fluorescent Intensity of Thrombocyte Indirect Antiglobulin Test

AITP = autoimmune hemolytic anemia (n = 50), RA = rheumatoid arthritis (n = 50), NAD = non-immune diseases (n = 50) and Normal = normal control subjects (n = 50)

Mean fluorescent intensity in AITP was significantly higher than the rest 3 groups ($p < 0.05$).



Flow Cytometric Antiglobulin Test for the Detection of Autoantibodies against Human Erythrocytes and Thrombocytes

Mundee Y^{*1}, Srihirunrat R¹, Charoenkwan P², Fongsatitkul L³ & Pattanapanyasat K⁴.



¹Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, ²Department of Pediatrics, ³Blood Bank Section, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, ⁴Office of Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand.

INTRODUCTION

Auto-immune hemolytic anemia (AIHA) and Auto-immune thrombocytopenic purpura (AITP) are particularly common auto-immune diseases among Thais. Apart from health history interview and physical examination, hematological tests are very helpful for establishing the definite diagnosis. Complete blood count (CBC) is routinely employed for the first sight into the differential diagnosis. Anemia with erythrocyte agglutination is pointing out to AIHA. While thrombocytopenia with thrombocyte agglutination is most likely to be AITP. However CBC is not specific to diagnose these diseases. Anti-globulin tests, both direct and indirect, are more specific to such disorders. Direct anti-globulin test (DAT) is used to detect antibodies already bound to cellular components such as erythrocytes and thrombocytes. On the other hand, indirect anti-globulin test (IAT) is used for detection of cellular bindable antibodies in the plasma or serum. Taking these 2 types of target cells (red blood cells, RBC & platelet, Plt) together, the tests are divided into 4 categories as RBC-DAT, RBC-IAT, Plt-DAT & Plt-IAT. Standard tube tests for these procedures are not sensitive and difficult especially for the platelet testing. Flow cytometry is easy, quick, reliable and objective. It is also applicable to these tests. Therefore flow cytometric antiglobulin tests both direct and indirect on both targeting cells (RBC & Plt) were developed and employed. They were compared with standard tube test for over all performance. The tests were further used in AIHA, AITP, other-auto-immune disease, non-auto-immune disease and healthy subjects for comparison of differential diagnostic potency.

CONCLUSION

Procedures for flow cytometric RBC-IAT, RBC-DAT, Plt-IAT & Plt-DAT were successfully developed. They were simple, quick, reliable and objective. They also gave a higher sensitivity than standard tube tests in particular the platelet testing.

ACKNOWLEDGEMENT

Thank:
Thailand Research Fund (TRF)
Department of Medical Technology,
Faculty of Associated Medical Sciences,
Department Pediatrics,
Blood Bank Section,
Faculty of Medicine,
Chiang Mai University,
Office of Research and Development,
Faculty of Medicine Siriraj Hospital,
Mahidol University.

MATERIALS AND METHODS

Standard tube tests

Indirect anti-globulin test (IAT): Patients' plasma or serum was incubated with either screening O RBC (from National Thai Red Cross) or fixed inactivated pooled O platelets (from Blood Bank), at 37°C for 30 minutes, then washed for 3 times, then anti-globulin serum was added, agglutination was examined, graded and recorded.

Direct anti-globulin test (DAT): Patients' RBC or platelets were washed for 3 times, then anti-globulin serum was added, agglutination was examined, graded and recorded.

These were done separately between RBC and platelets.

Flow cytometric tests

The samples (RBC & Plt) from standard tube tests were reacted with FITC conjugated anti-globulin serum instead of ordinary anti-globulin serum. The samples were then flow cytometric analysis. Fluorescent shift was determine and recorded. The higher mean fluorescent intensity is the stronger positivity.

RESULTS

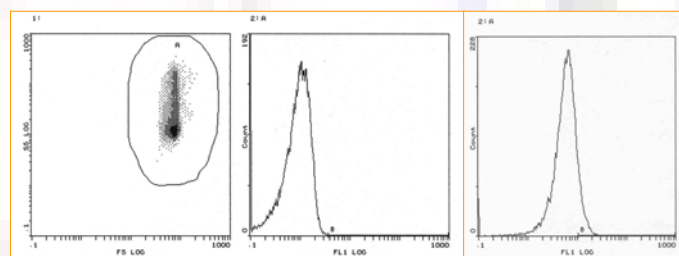


Figure 1 Flow cytometric histograms of erythrocytes

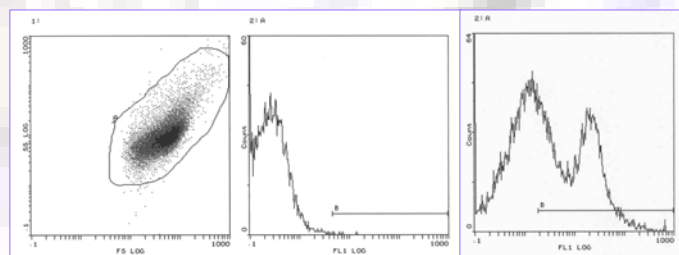


Figure 2 Flow cytometric histograms of thrombocytes

AUTHOR CONTACT

*Corresponding author: Dr Yuttana Mundee, PhD.
<yuttana@chiangmai.ac.th>
<myuttana@hotmail.com>