บทคัดย่อ

230948

รหัสโครงการ MRG4680015

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีโฟลไซโทเมทริกแอนติโกลบูลินเทสสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้

ชื่อนักวิจัย ดร.ยุทธนา หมั่นดี

ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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

โฟลไซโทเมทรีเป็นวิธีการทันสมัยที่ใช้ตรวจนับเซลล์อิสระ หรืออนุภาคที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวที่ไหลผ่านแสงเลเซอร์เป็นแถวเรียงเดี่ยว วิธีการนี้มีข้อดีกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง และ/หรือ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง เช่น ตรวจนับเซลล์เป็นจำนวนมาก ใช้เวลาน้อย ผลการตรวจมั่นคงแน่นอนไม่แปรเปลี่ยนไปตามความรู้และความชำนาญของผู้ตรวจ และมีความน่าเชื่อถือสูง แอนติโกลบูลินเทสเป็นวิธีการยอดนิยม ในการตรวจหาแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง ที่เรียกว่าแอนติโกลบูลินเทสทางตรง และยังใช้ตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงได้ ที่เรียกว่าแอนติโกลบูลินเทสทางอ้อม การตรวจแอนติโกลบูลินเทสทั้งทางตรงและทางอ้อม มีประโยชน์สูงในการตรวจวินิจฉัยและติดตามการรักษา โรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง และโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง การตรวจแอนติโกลบูลินเทสทั้งทางตรงและทางอ้อมนี้ สามารถปรับไปใช้วิธีโฟลไซโทเมทรีในการตรวจนับได้ ทั้งการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด สำหรับการตรวจนับเม็ดเลือดแดงนั้น สภาวะที่เหมาสมของแต่ละขั้นตอน คือ ใช้เม็ดเลือดแดงที่แขวนลอยในตัวกลางไอโซโทนิคบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ทำปฏิกิริยากับน้ำเหลืองในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์สาลายที่มีอัลบูมินของวัวละลายอยู่ร้อยละ 1 หลังจากนั้นให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ เอฟเอบีพายสองแอนติฮิวแมนโกลบูลิน ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสงชนิด ฟลูโอเรสซีนไอโซไทโอไซยาเนท (เรืองแสงสีเขียว ที่ความยาวเคลื่น 525 นาโนมิเตอร์) ในอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด จากนั้นเติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์สาลายที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ละลายอยู่ร้อยละ 1 แล้วจึงตรวจนับเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียวด้วยโฟลไซโทเมทรี สำหรับการตรวจนับเกล็ดเลือดนั้น สภาวะที่เหมาสมของแต่ละขั้นตอน เหมือนกันกับการตรวจเม็ดเลือดแดง แต่ใช้เกล็ดเลือด ในการทำปฏิกิริยาแทน สภาวะที่เหมาสมเหล่านี้ ให้ค่าเฉลี่ยความเข้มของการเรืองแสง (MFI) ที่ได้จากผู้ป่วย แตกต่างจากที่ได้จากคนปกติอย่างชัดเจน ค่าการตรวจทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ แอนติโกลบูลินเทสทางตรงของเม็ดเลือดแดง (E-DAT) แอนติโกลบูลินเทสทางอ้อมของเม็ดเลือดแดง (E-IAT) แอนติโกลบูลินเทสทางตรงของเกล็ดเลือด (T-DAT) และแอนติโกลบู

ลินเทสทางอ้อมของเกล็ดเลือด (T-IAT) ใช้วิธีการตรวจที่คล้ายกัน และใช้น้ำยาตรวจชุดเดียวกัน ต่อจากนั้นใช้น้ำยาตรวจและวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้ ตรวจหาค่าการตรวจทั้ง 4 ใน ผู้ป่วยโรคโลหิตจางเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเม็ดเลือดแดงของตนเอง (AIHA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคเลือดออกเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านเกล็ดเลือดของตนเอง (AITP, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบเนื่องจากการมีภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (roumatoid arthritis , RA, n = 50) กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (non-immune diseases, NAD, n = 50) และกลุ่มคนปกติ (Normal, n = 50) ที่ได้มาจาก โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม 2547 ถึง เดือนมิถุนายน 2550 โดยใช้เครื่องโฟลไซโทมิเตอร์จาก บริษัท เบคแมน คูลเตอร์ รุ่น อีปิคซ์ เอ็กซ์แอล ตั้งช่องรับสัญญานสีเขียวที่ความยาวคลื่น 530 นาโนมีเตอร์ 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 มีค่าสูงกว่าค่า MFI ที่ได้จากผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่ ค่า MFI ของการตรวจ T-DAT และ T-IAT ที่ได้จากผู้ป่วย RA, NAD และในคนปกติ ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีโฟลไซโทเมทริกแอนติโกลบูลินเทส สำหรับตรวจนับเม็ดเลือดแดง หรือเกล็ดเลือดที่มีแอนติบอดีเกาะอยู่ และการตรวจหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถเกาะกับเม็ดเลือดแดงหรือเกล็ดเลือดได้ ที่พัฒนขึ้นมานี้ สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรค AIHA และ AITP ได้ เนื่องจากค่า MFI ของผู้ป่วยดังกล่าว มีค่าสูงกว่า MFI ผู้ป่วยในกลุมอื่นๆ และในคนปกติอย่างชัดเจน นอกจากนั้นวิธีการนี้ยังสามารถใช้ตรวจหา ปฏิกิริยาหลังการเติมเลือด โรคเม็ดเลือดแดงสลายในเด็กแรกคลอด การตรวจหาหมู่เลือด และการตรวจความเข้ากันได้ของเลือด ได้อีกด้วย

230948

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 Mundee

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 maner. 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).