

บทนำ

วิธีมาตรฐานเพื่อตรวจหาและแยกชนิดของแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดง ในห้องปฏิบัติการ คลังเลือดทั่วไปคือวิธี Indirect antiglobulin test (IAT) ซึ่งอาศัยหลักการการทําปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่มีความจำเพาะกัน หลังจากที่ได้เติม antihuman globulin serum ลงไป จะเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงขึ้น สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกเหมาะสมกับการตรวจหาในจำนวนตัวอย่างทดสอบที่ไม่มากนัก แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อด้อยหลายประการคือ การอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยสายตา ต้องอาศัยความชำนาญมาก พบว่ามีความแปรปรวนสูง ทําให้เกิดผลผิดพลาดได้ง่าย(1) การทดสอบนี้มีความไวจำกัด สามารถตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง ตั้งแต่ 300-500 โมเลกุลขึ้นไป(2) นอกจากนี้แล้วในการที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก ๆ เมื่อใช้วิธีนี้ไม่สะดวก เพราะเป็นวิธีซึ่งทํานานหลอดทดลองต้องอาศัยพื้นที่อุปกรณ์ต่าง ๆ สิ้นเปลืองน้ำยา และสิ้นเปลืองมาก จากปัญหาเหล่านี้จึงได้มีผู้พยายามคิดค้นและปรับปรุงวิธีต่าง ๆ ขึ้นเช่น Autoanalyzer(3), Complement fixing antibody consumption test(4), Erythrocyte antibody rosette formation(5) หรือ Radioimmunoassay (RIA)(6) แม้ว่าวิธีเหล่านี้จะมีความไวมากกว่า IAT แต่ก็มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษที่สลับซับซ้อนตลอดจนน้ำยาไม่คงตัวมีอายุการใช้งานสั้น และสามารถเกิดอันตรายต่อผู้ทํา จึงมีผู้พยายามดัดแปลงวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เข้ามาช่วย ซึ่งเป็นวิธี macro method(7-17) โดยอาศัยหลักการคือ ทําให้ sensitized red cell ทําปฏิกิริยากับ enzyme conjugated anti-IgG จากนั้นจะวัด activity ของเอนไซม์ที่จับอยู่บนเม็ดเลือดแดง ถ้าบนเม็ดเลือดแดงมี IgG เกาะอยู่มาก ก็จะได้ activity ของเอนไซม์สูง Reppun(1) ได้นำเทคนิค microtiter assay เข้ามาใช้โดยใช้หลักการเดียวกันกับ macro method แต่จากเทคนิค ELISA ดังกล่าวยังมีปัญหา nonspecific binding และการแตกของเม็ดเลือดแดงซึ่งจะรบกวนผลของปฏิกิริยา คณะผู้วิจัยครั้งนี้จึงดัดแปลงวิธีของ Reppun โดยวัด activity ของ unbound enzyme conjugated anti-IgG ที่เหลืออยู่ใน supernatant แทนการวัด activity ของ bound enzyme บนเซลล์เม็ดเลือดแดง ทั้งนี้เพื่อขจัดปัญหาการแตกทําลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงและลดขั้นตอนการปั่นล้างเพื่อจะสามารถทําได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

ดัดแปลงเทคนิคไมโครเพลท enzyme-linked antiglobulin test (micro-ELAT) โดยวัด activity ของ enzyme conjugated anti IgG ที่เหลืออยู่หลังจากทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีบนเม็ดเลือดแดง (consumption test) เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดง

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างทดสอบ

1. Standard cells

เก็บตัวอย่างเลือด หมู่ O, R₁R₁ จากผู้บริจาคโลหิต ณ คลังเลือดกลาง คณะแพทย-
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในสารกันเลือดแข็งตัว (citrate phosphate dextrose :
CPD) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และทดสอบภายใน 7 วัน

2. Normal control

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิต ณ คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ขอนแก่น ในสารกันเลือดแข็งตัว CPD จำนวนทั้งสิ้น 20 ราย เก็บที่อุณหภูมิ 4°C และทดสอบภายใน
7 วัน

3. Negative control

เก็บซีรัมหมู่ AB จากผู้บริจาคโลหิตจำนวน 10 ราย ซึ่งให้ผลลบในการตรวจหาแอนติบอดี
ต่อเม็ดเลือดแดงโดยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ได้นำมา pooled รวมกัน และแบ่งเก็บในหลอด
เล็ก ๆ ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

2. วัสดุที่ใช้ในการทดสอบ

1. Standard anti-D (Rho) Immune globulin (Rhesuman Berna Swiss,
Serum and vaccine Institute Berne, Switzerland) มีความเข้มข้น 300
ug of anti-D/ml
2. anti-D (Ortho, Diagnostic)
3. Antihuman globulin (Ortho, Diagnostic)
4. Alkaline phosphatase conjugated antihuman IgG (μ -chain specific)
(Sigma Chemical Ltd. St. Louis, Missouri)
5. Alkaline phosphatase conjugated antihuman IgM (μ -chain specific)
(Sigma Chemical Ltd. St. Louis, Missouri)
6. p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) (Sigma chemical Ltd. St. Louis,
Missouri)

7. 2% bovine serum albumin- phosphate buffer saline pH 7.3 (2% BSA-PBS)
8. 0.2% bovine serum albumin- phosphate buffer saline pH 7.3 (0.2% BSA-PBS)
9. 0.2% bovine serum albumin- Unbuffer saline (0.2% BSA-NS)
10. Low ionic strength solution (LISS)
11. 0.05M Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6
12. 1 N NaOH

3. อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นสำหรับไมโครเฟลท
2. เครื่องปั่นทางคลังเลือด
3. ตู้บอดหนู 37°C
4. เครื่องอ่านไมโครเฟลท
5. ไมโครเฟลทรูปถ้วย

วิธีการ

1. การเตรียม standard cell

1. ปั่นแยก buffy coat ออกจากเลือดหมู่ O, R1R1 ได้ packed red cell (PRC)
2. ล้าง PRC 4 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือปกติ
3. เตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงเข้มข้น 5% ใน LISS ซึ่งจะมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 5×10^8 เซลล์/มล.

2. Enzyme conjugated antihuman globulin

ทำการเจือจาง alkaline phosphatase conjugated anti-IgG ด้วย 2% BSA-PBS เพื่อให้ได้อัตราการเจือจางตามต้องการ และสารละลายตัวนี้ต้องเตรียมมาใช้นิยทุกวัน

3. Substrate solution

นำ p-nitrophenyl phosphate ละลายใน 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้ทุกครั้ง

การทดสอบด้วย micro-ELAT ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ sensitization, antiglobulin reaction และ enzyme reaction โดยเตรียม standard curve ดังนี้

ก. ขั้นตอน sensitization

1. เตรียม standard anti-D (Rho) ใน 2% BSA-PBS ให้มีอัตราการเจือจาง 1:1000, 1:2000, 1:4000 ถึง 1:16000
2. เติม diluted standard anti-D ปริมาตร 100 ul ลงในหลุมไมโครเพลท
3. เติม 5% cell ใน LISS ปริมาตร 100 ul ในหลุมข้อ 2
4. เคาะम्मเพลทเบา ๆ ให้สารผสมกัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 15 นาที
5. ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 0.2% BSA-PBS โดยใช้เครื่องปั่นไมโครเพลท
6. เติม 0.2% BSA-PBS ปริมาตร 100 ul เขย่าให้เข้ากัน
7. ดูดเซลล์ในข้อ 6 ปริมาตร 50 ul ใส่ในไมโครเพลทอันใหม่
8. ล้างเซลล์อีกครั้งด้วย 0.2% BSA-PBS ซับให้แห้ง

ข. ขั้นตอน antiglobulin reaction

1. เติม enzyme conjugated antihuman globulin ที่เจือจางแล้วปริมาตร 100 ul ลงในแต่ละหลุม
2. เคาะम्मเพลทเบา ๆ นำไปอุ่นที่ 37° นาน 60 นาที
3. นำเพลทไปปั่นในเครื่องปั่นไมโครเพลทเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกที่ก้นหลุม
4. ดูด supernatant 50 ul ใส่ในเพลทใหม่

ค. ขั้นตอน enzyme reaction

1. เติม substrate solution ปริมาตร 100 ul ลงในหลุมทุกหลุม
2. เคาะम्मเพลทเบา ๆ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 60 นาที
3. เติม 1 N NaOH ปริมาตร 50 ul ลงไป

4. นำไปวัดค่า absorbance ที่ wavelength 405 nm.

ในการทดสอบหาปริมาณ IgG ที่เกาะบนเซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย หรือของผู้บริจาคโลหิต จะเตรียมเซลล์ให้มีความเข้มข้น 5% ในน้ำเกลือ และนำเซลล์ที่เตรียมแล้วปริมาตร 50 ul ใส่ลงในหลุมไมโครเพลท ล้าง 4 ครั้งด้วย 0.2% BSA-PBS ซับให้แห้ง และเติม enzyme conjugated anti-IgG ลงไปตามขั้นตอน antiglobulin reaction

ตัวอย่างควบคุม

1. Positive control

เจือจาง anti-D ด้วย 2% BSA-PBS ให้ได้ 1:200⁽¹⁴⁾ สำหรับตัวอย่างควบคุมประจำวัน โดยใช้ anti-D เจือจางแทน standard anti-D ในขั้นตอน sensitization

2. Negative control

ใช้ AB serum แทน standard anti-D ในขั้นตอนการ sensitization

3. Nonspecific binding of enzyme conjugated

ใช้ 2% BSA-PBS แทน standard anti-D ในขั้นตอนการ sensitization เพื่อดูว่า enzyme conjugated สามารถจับบนเม็ดเลือดแดงหรือไม่

4. Reagent blank

ในหลุม reagent blank จะใส่ substrate solution ปริมาตร 100 ul, 2% BSA-PBS ปริมาตร 50 ul, และ 1N NaOH ปริมาตร 50 ul หลุม reagent blank ใช้ทดสอบว่า substrate สามารถมี spontaneous hydrolysis หรือไม่

ในการทดสอบ micro-ELAT ทุก test ในการวิจัยครั้งนี้จะทดสอบแบบ duplicate และนำค่า absorbance ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณ Standard curve⁽¹⁵⁾

ในการเจือจาง standard anti-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเคลือบ IgG บนเม็ดเลือดแดง ความเข้มข้นของแอนติบอดี (IgG) ที่จับอยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือด สามารถคำนวณโดย standard anti-D ที่ใช้มีความเข้มข้น 300 ug anti-D/ml. ในหลุมที่ 1 ใน standard curve ใช้ 100 ul ของ 1:1000 anti-D ทำปฏิกิริยากับ 5% cell ปริมาตร 100 ul (0.5×10^8 cells) ทำการคำนวณปริมาณ IgG ที่จับบนเม็ดเลือดแดง โดย IgG 1 mole มีน้ำหนักเท่ากับ 1.5×10^5 กรัม และสาร 1 mole มีจำนวนเท่ากับ 6×10^{23} โมเลกุล

$$\begin{aligned}
\text{ในหลุมที่ 1 จะมีปริมาณ anti-D} &= \frac{30 \times 10^{-9} \text{ g anti-D}}{1.5 \times 10^5 \text{ g/mole}} \\
&= 2 \times 10^{-13} \text{ moles} \\
&= (2 \times 10^{-13})(6 \times 10^{23} \text{ molecules/mole}) \\
&= 12 \times 10^{10} \text{ molecules} \\
&= \frac{12 \times 10^{10}}{0.5 \times 10^8} \text{ molecules/cell} \\
&= 2400 \text{ molecules/cell}
\end{aligned}$$

วิธีการทดสอบ

1. การปรับมาตรฐานวิธี micro-ELAT

1.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมการทาบฏิกิริยาของ enzyme ทดสอบโดยเจือจาง enzyme conjugated ด้วย 2% BSA-PBS ที่อัตราการเจือจาง 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000 นำ enzyme conjugated ที่เจือจางแล้ว 50 ul ทาบฏิกิริยากับ substrate 100 ul ที่ระยะเวลา 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นเติม 1 N NaOH ปริมาตร 50 ul เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่า absorbance ที่ 405 nm

1.2 การทดสอบหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ enzyme conjugated anti-IgG ทดสอบโดยเจือจาง anti-D ที่อัตราการเจือจาง 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 และเจือจาง enzyme conjugated ที่อัตราการเจือจาง 1:6000, 1:8000, 1:10000, 1:12000, 1:14000, 1:16000, 1:18000, 1:20000 ทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีเตรียม standard curve ตามที่กล่าวมาแล้ว นำค่า absorbance ที่ได้มาคำนวณ เพื่อหาอัตราการเจือจางของ enzyme conjugated ที่เหมาะสม

ผลการทดลอง

1.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาของ enzyme conjugated

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาของ enzyme conjugated โดยนำ enzyme conjugated ที่อัตราการเจือจางต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับ substrate ที่ระยะเวลา 30, 45 และ 60 นาที ได้ผลดังตารางที่ 1 จะเห็นว่าอัตราการเพิ่มของค่า absorbance (OD) ที่ 60 นาที ให้ค่าสูงกว่าที่ 45 นาทีคือ ผลต่างของ OD ที่ 60 และ 45 นาที (B*) ให้ค่ามากกว่าผลต่างของ OD ที่ 45 และ 30 นาที (A*) ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของ enzyme conjugated ในการย่อย substrate ที่ 60 นาที

ตารางที่ 1 ค่า absorbance ที่ได้ เมื่อให้ enzyme ทำปฏิกิริยากับ substrate ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ enzyme conjugated	O.D. ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา				
	30 นาที	A*	45 นาที	B*	60 นาที
1:8000	1.18	0.40	1.58	0.63	2.21
1:16000	0.67	0.21	0.88	0.40	1.28
1:32000	0.36	0.13	0.49	0.22	0.71
1:64000	0.22	0.07	0.29	0.09	0.38

$$A^* = \text{OD ที่ 45 นาที} - \text{OD ที่ 30 นาที}$$

$$B^* = \text{OD ที่ 60 นาที} - \text{OD ที่ 45 นาที}$$

2. ผลการศึกษาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ enzyme conjugated anti-IgG เมื่อนำ enzyme conjugated ที่อัตราการเจือจางต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่ถูกเคลือบด้วย anti-D และวัด activity ของ unbound enzyme conjugated ที่เหลือได้ผลตามตารางที่ 2 จะเห็นว่าค่า absorbance ที่อัตราเจือจางต่าง ๆ ของ anti-D ของแต่ละความเข้มข้นของ enzyme ให้ค่าไม่แตกต่างกัน ($P>0.025$) จึงได้ทำการทดสอบใหม่อีกครั้ง โดยการเจือจาง enzyme conjugated ตั้งแต่ 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000 และเจือจาง anti-D ตั้งแต่ 1:50, 1:150, 1:450, 1:1350, 1:4050 ได้ผลตามตารางที่ 3 ซึ่งเมื่อนำค่า absorbance ที่ได้ไปทดสอบทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.025$)

ตารางที่ 2 แสดงค่า absorbance ในการหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ enzyme conjugated anti IgG ครั้งที่ 1

อัตราการเจือจางของ	อัตราการเจือจางของ enzyme conjugated anti-IgG							
anti-D	1:6000	1:8000	1:10000	1:12000	1:14000	1:16000	1:18000	1:20000
1:200	3.102	2.763	2.380	2.360	1.927	1.736	1.616	1.329
1:400	3.165	2.766	2.417	2.168	1.874	1.726	1.536	1.214
1:800	3.165	2.564	2.370	2.131	1.874	1.687	1.548	1.297
1:1600	3.165	2.612	2.344	2.129	1.820	1.652	1.520	1.218
AB serum	3.102	2.712	2.260	2.090	1.817	1.622	1.448	1.237

ตารางที่ 3 แสดงค่า absorbance ที่ได้ในการหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของ enzyme conjugated anti-IgG ครั้งที่ 2

อัตราการ เจือจางของ	อัตราการเจือจางของ enzyme conjugated anti-IgG					
anti-D	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000
1:50	1.509	0.914	0.477	0.297	0.213	0.165
1:150	1.435	0.884	0.473	0.297	0.204	0.176
1:450	1.485	0.871	0.475	0.293	0.206	0.157
1:1350	1.499	0.856	0.479	0.314	0.216	0.154
1:4050	1.497	0.839	0.486	0.283	0.220	0.160
AB serum	1.525	0.880	0.467	0.289	0.213	0.163

ดังนั้นการทดสอบหาปริมาณ IgG ที่เกาะบนเม็ดเลือดแดงโดยการวัด activity ของ unbound enzyme conjugated โดยตรงไม่สามารถทำได้ เพราะค่า absorbance ที่วัดได้ไม่สามารถบอกความแตกต่างของปริมาณ IgG บนเม็ดเลือดแดง

วิจารณ์

ได้มีผู้ประยุกต์เทคนิค Enzyme-linked antiglobulin test (ELAT) ใช้ตรวจหาแอนติบอดีบนเม็ดเลือดแดง โดยการตรวจวัด activity ของ enzyme conjugated anti-IgG ที่จับกับ IgG บนเม็ดเลือดแดงโดยตรง ซึ่งมีปัญหาหลายประการ คือการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง เมื่ออยู่ในตัวกลางสารละลายสับสเตรท ซึ่งเป็นด่าง (pH 9.6) ทำให้ฮีโมโกลบินออกจากเม็ดเลือดแดงอยู่ในสารละลาย และฮีโมโกลบินนี้สามารถดูดกลืนแสงที่มีช่วงคลื่น 405-415 nm. ได้⁽¹¹⁾ ทำให้เกิดผลบวกปลอม การวิจัยครั้งนี้จึงได้ดัดแปลงโดยตรวจวัด activity ของ unbound enzyme conjugated anti-IgG ซึ่งเป็น consumption test

จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ enzyme conjugated anti-IgG ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจากการทดลอง เมื่อใช้ anti-D เจือจางตั้งแต่ 1:200 จนถึง 1:16000 และ enzyme conjugated anti-IgG ที่ 1:6000 ถึง 1:20000 พบว่าเมื่อเคลือบให้ IgG เกาะบนเซลล์เม็ดเลือดแดงในปริมาณมาก ๆ (anti-D 1:200) และในปริมาณน้อย ๆ (anti-D 1:10000) ค่า absorbance ของ consumption test ที่ได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุการเจือจาง anti-D มากเกินไป หรือใช้ enzyme conjugated anti-IgG เข้มข้นเกินไป จึงได้ทดสอบใหม่โดยเจือจาง anti-D ตั้งแต่ 1:50 จนถึง 1:4050 และเจือจาง enzyme conjugated anti-IgG ตั้งแต่ 1:10000 จนถึง 1:320000 ก็พบว่าให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือค่า absorbance ของ consumption test ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และได้ทำการทดสอบในลักษณะเช่นนี้ซ้ำหลาย ๆ ครั้งก็ให้ผลเช่นเดิม จึงเห็นว่าการวัด activity ของ unbound enzyme conjugated anti-IgG โดยตรง เพื่อตรวจวัดปริมาณของ IgG ที่เกาะบนเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้ เนื่องจากการทดสอบมีความไวไม่เพียงพอ

Kiruba และ Han⁽¹⁶⁾ ได้ตรวจวัด unbound enzyme conjugated anti-IgG โดยการใช้ IgG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เคลือบที่ microplate ก่อนแล้วจึงเติม unbound enzyme ลงไป เพื่อให้ unbound enzyme conjugated anti-IgG จับกับ IgG ที่ plate จากนั้นจึงล้างและเติมสับสเตรทเพื่อวัด activity

คณะผู้วิจัยจึงได้วัด consumption test คล้ายกับของ Kiruba โดยการเคลือบ Immunoglobulin (AB serum) ที่ microplate ก่อน จากนั้นจึงเติม unbound enzyme conjugated anti-IgG ลงไปและวัด activity ของ enzyme ที่ได้ พบว่าเมื่อเจือจาง standard anti-D เพื่อตรวจการเจือจาง 1:200 ถึง 1:6400 นำไปเคลือบบนเม็ดเลือดแดง (ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยวิธี antiglobulin test เพื่อดูว่ามี IgG เกาะบนเม็ดเลือดแดงหรือไม่

พบว่าให้ปฏิกิริยาตั้งแต่ 4+ จนถึง 1+) จากนั้นจึงนำไปทดสอบกับ enzyme conjugated anti-IgG ที่เจือจาง 1:2000 และนำ unbound enzyme conjugated ไปใน coated microplate จากนั้นจึงล้างส่วนที่ไม่จับกับ microplate ออกไป และวัด activity ของ enzyme ที่ plate พบว่าค่า absorbance ที่ได้มีความแตกต่างกัน คือในกรณีที่มี IgG จับอยู่บนเม็ดเลือดแดงมาก ค่า absorbance ของ consumption test จะต่ำ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองหาความสามารถของ unbound enzyme conjugated anti-IgG ในการตรวจวัดปริมาณ IgG พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณ IgG ต่ำถึง 3.28 ng/well ในขณะที่ Kiruba⁽¹¹⁾ สามารถวัดปริมาณ IgG ได้ต่ำถึง 0.8 ng/well

โดยสรุปแล้ววิธีการตรวจวัดปริมาณ IgG บนเม็ดเลือดแดงโดยวัด unbound enzyme conjugated anti-IgG โดยตรงไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากไม่มีความไวพอ แต่สามารถวัด unbound enzyme conjugated anti IgG โดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่เคลือบบนไมโครเพลทก่อน และวัด activity ของ enzyme พบว่าสามารถนำไปใช้ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบโดยวิธีนี้ยังต้องปรับมาตรฐานต่าง ๆ เสียก่อนจึงสามารถนำไปใช้ได้