

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO THẺ XÉT NGHIỆM ĐỊNH NHÓM MÁU HỆ ABO TẠI GIƯỜNG BỆNH

Thắm Thị Thu Nga, Nguyễn Văn Cường

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Xét nghiệm định nhóm máu là một xét nghiệm đầu tiên và cần thiết cho hầu hết bệnh nhân khi nhập viện. Phổ biến trong các phòng xét nghiệm là phương pháp huyết thanh màu được làm trên phiến kính. Ngày nay, xu hướng sử dụng các bộ kit đầy đủ cho xét nghiệm đã trở nên phổ biến. Với mục đích làm tăng tính tiện dụng cho người sử dụng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo kit xét nghiệm định nhóm máu hệ ABO dạng thẻ. Thẻ xét nghiệm được chế tạo dựa trên nguyên tắc phản ứng ngưng kết của hồng cầu với kháng thể được làm khô phủ trên thẻ. Nhiều loại màng khác nhau đã được sử dụng cho nghiên cứu: màng nitrocellulose, immunodyne, UltraBind, Cellulose film, màng PVDF và màng nylon. Màng Cellulose film có độ nhạy cao nhất, tiện lợi khi gắn lên thẻ và giá thành chấp nhận được. Lượng huyết thanh màu đưa lên thẻ là 50 μ l. Độ nhạy của thẻ là 97,2%, độ đặc hiệu là 100%. Thẻ có ưu điểm xác định nhóm máu nhanh, cho kết quả chính xác sau 2 phút, đơn giản, dễ sử dụng, giá cạnh tranh với thẻ nhập ngoại.

Từ khóa: kháng thể chống A, kháng thể chống B, màng, nhóm máu ABO, thẻ xét nghiệm

MỞ ĐẦU

Nhóm máu hệ ABO được Karl Landsteiner phát hiện năm 1901, và là hệ nhóm máu quan trọng nhất cần được kiểm tra khi truyền máu hoặc cấy ghép cơ quan trong số gần 30 hệ nhóm máu được biết đến. Nhóm máu hệ ABO được xác định dựa trên sự có mặt hay vắng mặt kháng nguyên A, B trên bề mặt tế bào hồng cầu và bằng sự có mặt hay vắng mặt kháng thể chống A, B có trong huyết thanh. Trong các phòng xét nghiệm tại các bệnh viện, việc định nhóm máu hệ ABO phần lớn được làm theo phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu trên phiến kính, đá men hoặc ống nghiệm. Gần đây, các xét nghiệm thực hiện với máy xét nghiệm sinh hóa tự động thường chỉ làm với số mẫu lớn không thích hợp cho xét nghiệm những trường hợp đơn lẻ cần kết quả ngay, giá thành đầu tư mua máy rất cao, cần có xét nghiệm viên được đào tạo chuyên nghiệp. Trên thế giới, đã có nghiên cứu chế tạo thẻ xét nghiệm định nhóm máu ABO từ những năm 50 (Eldon, 1956). Ở Việt Nam, đã có một số công ty bắt đầu cung cấp các bộ kit xét nghiệm định nhóm máu nhập ngoại. Đây là một bộ kit tương đối đơn giản, hoàn toàn có thể nghiên cứu và sản xuất trong nước nhằm hạ giá thành sản phẩm. Sử dụng kit dạng thẻ "ready to use" trong xét nghiệm có ưu điểm rất lớn là an toàn cho người sử dụng, hạn chế sự lây nhiễm bệnh cho cả các nhân viên y tế đặc biệt trong thời điểm hiện nay khi nhiều bệnh nguy hiểm truyền nhiễm qua đường máu

ngày càng gia tăng và đồng thời sử dụng thẻ xét nghiệm cũng thể hiện tính chuyên nghiệp trong công tác xét nghiệm. Thẻ xét nghiệm định nhóm máu hệ ABO cũng có thể được sử dụng tại nhà nhờ tính đơn giản, dễ sử dụng, đọc kết quả bằng mắt thường không cần đến các trang thiết bị đặc biệt. Hiện nay, nhiều phòng xét nghiệm trên thế giới đều sử dụng thẻ xét nghiệm cho việc định nhóm máu, chủ yếu từ các nhà sản xuất có uy tín như Eldon, Ortho. Các bộ kit xét nghiệm này có độ chính xác cao, tuy nhiên, giá thành còn rất cao so với khả năng chi trả của người bệnh ở nước ta. Mục đích của nghiên cứu này là tạo bộ kit xét nghiệm có độ nhạy gần tương đương với bộ kit nhập ngoại nhưng giá thành thấp hơn, cạnh tranh được với các loại kit có trên thị trường.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Kháng thể sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm huyết thanh mẫu anti-A, anti-B, anti-AB của BioRad, Biotest, Biotec.

Màng nitrocellulose 0,45 μ m (BioRad), immunodyne 0,45 μ m (Pall), UltraBind 0,45 μ m (GelmanSciences), Cellulose film (Sigma), màng PVDF 0,02 μ m (BioRad) và màng nylon (MS).

Phương pháp

Sử dụng phương pháp huyết thanh mẫu.

(Vincent, 1918).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trên thế giới, có nhiều bộ kit xét nghiệm nhóm máu hệ ABO phổ biến nhất là ở dạng ống gel và gần đây xuất hiện một số kit dạng thẻ (Ulthemann, Weber, 1982; Rachel, Pfapp, 1990; Malomigré, Neumeuster, 2009). Kit xét nghiệm sử dụng ống gel với lớp gel gắn kháng thể, tương đối công kênh về hình thức và phức tạp khi sử dụng vì cần có máy ly tâm và giá thành bộ kit cao. Qua nghiên cứu nhiều tài liệu về các bộ kit, chúng tôi quyết định chế tạo bộ kit này ở dạng thẻ, nhằm đơn giản hoá cho người sử dụng và hạ giá thành sản phẩm để có thể cạnh tranh với các sản phẩm khác đã có trên thị trường.

Xét nghiệm định nhóm máu ABO dựa trên phản ứng ngưng kết của kháng thể với kháng nguyên hữu hình, do đó có thể dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Đây là một xét nghiệm nhanh tương đối đơn giản hơn so với nhiều xét nghiệm khác do chỉ cần phủ duy nhất một kháng thể lên màng và phản ứng thực hiện tại chỗ ngay tại điểm tra mẫu không cần sự dịch chuyển bằng mao dẫn tới vị trí đọc kết quả.

Phản ứng ngưng kết của kháng nguyên và kháng thể cho kết quả rõ nét nhất khi có tỷ lệ kháng nguyên kháng thể phù hợp. Giọt máu mang xét nghiệm quá to hoặc quá nhỏ so với lượng kháng thể cung cấp đều dễ gây nhầm lẫn cho người đọc kết quả. Nếu lượng huyết thanh mẫu quá nhiều không cần thiết so với lượng tế bào hồng cầu cũng làm tăng giá thành sản phẩm. Việc thử nghiệm phủ kháng thể lên màng được tiến hành với 3 thể tích khác nhau của huyết thanh mẫu: 30 μ l, 50 μ l, 70 μ l.

Sau khi phủ kháng thể lên thẻ, làm khô và tiếp tục phủ 15 μ l BSA 22% trong PBS lên màng. Trong trường hợp kháng thể IgG (chiếm tỷ lệ thấp, chủ yếu là IgM) không gây ngưng kết RBCs trong saline

nhưng có thể gây ngưng kết khi trộn với BSA và sẽ không có phản ứng âm tính giả. Kháng thể khô được bảo quản tốt trong khoảng 2-8°C có độ bền cao, giữ hoạt tính tới 5 năm (McGowan *et al.*, 1989; Shields, Camp Frank, 1989). Xét nghiệm trên thẻ được làm đồng thời với xét nghiệm thông thường trên phiến kính để làm đối chứng kiểm tra kết quả.

Xét nghiệm nhóm máu với các thẻ phủ kháng thể trên cho kết quả về độ nhạy như bảng 1.

Với thẻ phủ 30 μ l huyết thanh mẫu, tiết kiệm được chi phí hoá chất, thời gian làm khô nhanh, song do lượng huyết thanh ít hơn so với lượng hồng cầu nên kết quả xét nghiệm có sai số lớn do một số mẫu cho kết quả âm tính giả. Bảng mắt thường cũng có thể nhận thấy việc đọc kết quả khó khăn hơn so với hai trường hợp còn lại. Với thẻ phủ 50 μ l và 70 μ l huyết thanh mẫu đều cho kết quả tốt. Tuy nhiên, nếu phủ 70 μ l huyết thanh mẫu thì thời gian làm khô quá lâu và lượng huyết thanh nhiều làm tăng giá thành bộ kit lên đáng kể. Sử dụng kháng thể mẫu của các băng cung cấp khác nhau cho kết quả tương tự, không có sự sai khác đáng kể.

Thử nghiệm gắn kháng thể lên một số loại màng khác nhau. Để tìm loại màng gắn phù hợp cho xét nghiệm, chúng tôi tiến hành nghiên cứu gắn kháng thể lên một số loại màng thường dùng gắn protein trong các kit xét nghiệm dạng que thử: nitrocellulose (BioRad), immunodyne (Pall), UltraBind (GelmanSciences).

Với những loại màng này, việc gắn kháng thể lên màng không quá phức tạp và có thể thực hiện phản ứng ngưng kết để xác định nhóm máu. Tuy nhiên, việc đọc kết quả bằng mắt thường không dễ. Nguyên nhân là do các kháng thể bám vào bên trong màng nên khi phản ứng ngưng kết xảy ra các tế bào hồng cầu tụ lại với nhau thành từng đám rất nhỏ trên bề mặt màng, khó xác định phản ứng dương tính hay không. Để đọc kết quả chính xác cần có kính hiển vi hoặc xét nghiệm viên giàu kính nghiệm.

Bảng 1. Độ nhạy của thẻ xét nghiệm với lượng huyết thanh mẫu khác nhau.

Nhóm máu	Số mẫu	Lượng kháng thể phủ lên màng		
		30 μ l	50 μ l	70 μ l
Nhóm A	18	88,9 %	94,4%	94,4%
Nhóm B	10	90,0%	100%	100%
Nhóm AB	12	91,7%	91,7%	91,7%
Nhóm O	18	100%	100%	100%
Trung bình		92,7%	96,5%	96,5%

Bảng 2. Độ nhạy của thẻ xét nghiệm sử dụng các loại màng Nitrocellulose, Immunodyne, UltraBind.

Nhóm máu	Số mẫu	Màng		
		Nitrocellulose	Immunodyne	UltraBind
Nhóm A	29	89,6%	86,2%	93,1%
Nhóm B	34	94,1%	91,2%	91,2%
Nhóm AB	25	80,0%	84,0%	80,0%
Nhóm O	48	100%	100%	97,9%
Trung bình		90,9%	90,4%	90,6%

Ngoài những loại màng trên, chúng tôi còn tìm kiếm một số màng kỵ nước sử dụng như một giá thể có thể gắn cố định kháng thể lên đó để thực hiện phản ứng là màng cellulose film, màng PVDF kỵ nước và màng nylon. Các loại màng này có tính chất trơn nhẵn, bán thấm hoặc không thấm nước, trơ, không tương tác hoá lý làm giảm hoạt tính protein bám trên bề mặt. Màng PVDF còn có khả năng gắn protein cao hơn so với màng nitrocellulose và có khả năng gắn tốt với các protein khó gắn lên màng như glycoproteins. Có thể thấy một sự khác biệt lớn giữa việc gắn kháng thể lên bề mặt màng thấm nước và màng không thấm nước. Khi nhò kháng thể lên màng film, màng PVDF và màng nylon do tính không thấm nước nên kháng thể không thấm rộng ra bên ngoài, có thể nhò toàn bộ lượng kháng thể cần cho lên màng cùng một lúc, sau đó làm khô bằng nhiệt hoặc hút chân không. Thời gian làm khô từ 30 đến

50 phút, lâu hơn so với sử dụng màng nitrocellulose, song lại giảm tác khí phải nhò từ từ từng lượng nhỏ kháng thể lên màng.

Kết quả độ nhạy xét nghiệm định nhóm máu trên màng PVDF, cellulose film và màng nylon thể hiện trong bảng 3.

Để tạo kit xét nghiệm dạng thẻ, cần cố định được màng gắn protein lên thẻ. Thông thường, để dán màng gắn protein lên thẻ có thể sử dụng keo gắn. Một số loại màng như cellulose film được cung cấp có phủ sẵn lớp keo ở mặt sau (membrane backing). Loại màng này rất tiện dụng, giá thành hợp lý. Độ nhạy của màng cũng đáp ứng được yêu cầu chế tạo thẻ. Vì thế chúng tôi quyết định sử dụng loại màng này cho thẻ xét nghiệm định nhóm máu. Màng được ép lên thẻ bằng nhiệt, sau đó tiến hành phủ kháng thể lên các vị trí phản ứng.

Bảng 3. Độ nhạy của thẻ xét nghiệm sử dụng các loại màng PVDF, cellulose film, nylon

Nhóm máu	Số mẫu	Màng		
		PVDF	Cellulose film	Nylon
Nhóm A	30	96,7%	96,7%	93,3%
Nhóm B	22	95,5%	95,5%	100%
Nhóm AB	11	90,9%	100%	100%
Nhóm O	49	98,0%	100%	98,0%
Trung bình		95,3%	98,1%	97,8%



Hình 1. Phủ kháng thể lên thẻ đã được ép màng cellulose film. 1: Kháng thể chống A; 2: Kháng thể chống B; 3: Kháng thể chống AB.



Hình 2. Xét nghiệm (nhóm máu B) trên thẻ ép màng cellulose film. 1: Phản ứng của mẫu với kháng thể chống A không có ngưng kết; 2: Phản ứng của mẫu với kháng thể chống B có ngưng kết; 3: Phản ứng của mẫu với kháng thể chống AB có ngưng kết.

So sánh độ nhạy và độ chính xác của thẻ:

Để kiểm tra độ nhạy của thẻ, làm song song xét nghiệm trên thẻ và xét nghiệm trên phiến kính và trong tube theo phương pháp huyết thanh máu.

Kết quả kiểm tra độ nhạy và mức độ đặc hiệu của thẻ định nhóm máu như sau:

Độ nhạy của xét nghiệm được hiểu là tỷ lệ mẫu dương tính đúng được phát hiện chính xác bởi phép thử. Độ nhạy 100% có nghĩa là xét nghiệm phát hiện đúng tất cả các trường hợp dương tính. Độ đặc hiệu của xét nghiệm là tỷ lệ mẫu âm tính được xác định đúng. Độ đặc hiệu 100% có nghĩa là tất cả các trường hợp âm tính đều đúng. (Altman, Bland, 1994)

Mẫu máu sử dụng trong xét nghiệm là máu mới thu thập, phần lớn được xét nghiệm ngay hoặc bảo quản không quá 2 ngày. Vì vậy chưa thể loại bỏ hoàn toàn những mẫu bệnh lý hoặc mẫu thuốc nhóm máu A, phản ứng yếu, có khả năng gây ảnh hưởng đến kết quả định nhóm máu bằng phương pháp này. Kết quả xét nghiệm sử dụng thẻ chính xác 97,2% cho xét nghiệm lần đầu tiên. Mặc dù chưa đạt được yêu cầu đặt ra ban đầu là độ chính xác 100%. Tuy nhiên, đây

là một kết quả tương đối cao ngay cả khi so sánh với phương pháp thường quy trong labo. Trên thế giới, thẻ xét nghiệm của EldonCard (Đan Mạch) có thể nói là xuất hiện lâu nhất, từ năm 1950 cho độ chính xác gần như tuyệt đối, chỉ có 0,3% lỗi khi xét nghiệm nhóm ABO (Fildon, 1956). Sai số trong các xét nghiệm kể cả sử dụng bộ kit hay sử dụng phương pháp thường quy do nhiều nguyên nhân khác nhau là điều không thể tránh khỏi (Migeot *et al.*, 2002). Việc đưa ra kết luận với những mẫu cho kết quả không rõ ràng, trước hết cần lặp lại xét nghiệm và sau đó kết hợp với các xét nghiệm khác. Để đảm bảo truyền máu an toàn, nhất thiết phải làm phản ứng chéo giữa huyết thanh của người cho với hồng cầu rửa của người nhận và ngược lại. Phản ứng này không cần thiết phải cung cấp huyết thanh hay hồng cầu mẫu do đó chúng tôi không đưa vào thẻ xét nghiệm mà chỉ khuyến cáo làm trước khi truyền máu. Để kiểm tra độ nhạy của thẻ, cần tiếp tục xét nghiệm với số mẫu lớn hơn để có kết luận chính xác. Ngoài ra, để giảm sai số trong xét nghiệm, cần tìm hiểu rõ được tiền sử bệnh của người có nhóm máu được xét nghiệm để loại bỏ mọi nguyên nhân làm sai lệch kết quả.

Bảng 4. Độ nhạy và độ đặc hiệu của thẻ xét nghiệm được chế tạo so với kit xét nghiệm Grifols Gel Card.

Nhóm máu	Số mẫu	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	Độ nhạy (%) của kit Grifols Gel Card	Độ đặc hiệu (%) của kit Grifols Gel Card
Nhóm A	57	96,5	100	100	100
Nhóm B	52	100	100	100	100
Nhóm AB	13	92,3	100	100	100
Nhóm O	96	100	100	100	100
Trung bình		97,2	100	100	100

Độ nhạy (Số mẫu dương tính đúng/số mẫu dương tính đúng + số mẫu âm tính giả) x 100; Độ đặc hiệu (Số mẫu âm tính đúng/số mẫu âm tính đúng + số mẫu dương tính giả) x 100

KẾT LUẬN

1. Sử dụng huyết thanh máu đã được tối ưu nồng độ kháng thể cho xét nghiệm định nhóm máu với hàm lượng đưa lên màng là 50 μ l mỗi loại.

2. Sử dụng màng gắn protein: nitrocellulose, immunodyne, UltraBind gắn kháng thể chống A, chống B, chống AB xác định nhóm máu ABO dựa trên phản ứng ngưng kết cho kết quả độ nhạy lần lượt là 90,9; 90,4 và 90,6%.

3. Màng PVDF, màng cellulose film và màng nylon sử dụng tốt trong việc gắn kháng thể dùng trong xét nghiệm ngưng kết định nhóm máu. Kết quả

cho thấy độ nhạy là 95,3; 98,1 và 97,8%.

4. Thẻ định nhóm máu do đề tài sản xuất thứ có giá thành khoảng 4100VNĐ/thẻ đơn, độ nhạy trung bình là 97,2%, độ đặc hiệu 100%, xác định nhóm máu nhanh, chính xác sau 2 phút, dễ sử dụng.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ kinh phí của Viện Công nghệ sinh học cho đề tài cấp cơ sở.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Altman DG, Bland JM (1994) Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity *BMJ* 308: 1552.

Eldon K (1956) Experience with ABO and Rh blood-grouping cards (Eldon cards) *Br Med J* 2(5003): 1218-1220.

McGowan A, Tod A, Chirside A, Green C, McColl K, Moore S, Yap PL, McClelland DB, McCann MC, Micklem LR, *et al.* (1989) Stability of murine monoclonal anti-A anti-B and anti-AB, grouping reagents and a multi-centre evaluation of their performance in routine use. *Vox Sang* 56(2):122-130.

Malorogré W, Neumeister B (2009) Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem* 393(5): 1443-1451.

Migeot V, Ingrand I, Salmi LR, Ingrand P (2002)

Reliability of bedside ABO testing before transfusion. *Transfuslon* 42(10):1348-55.

Rachel JM, Plapp FV (1990) Bedside blood grouping. *Med Lab Sci* 47(4): 330-6.

Shields CE, Camp Frank R Jr (1998) Testing of blood grouping under field-type conditions. Defense Technical Information Center OAI-PMH Repository.

Uthemann H, Weber M (1982) Securing the ABO-identity by serafool before blood transfusions. *Anaesthetist* 31(4): 204-5.

Vincent B (1918) A rapid macroscopic agglutination test for blood groups, and its value in testin donors for transfusion. *Jama* 70(17):1219-1220

PRODUCTION OF BEDSIDE CARD FOR ABO BLOOD GROUPING DETERMINATION

Tham Thi Thu Nga*, Nguyen Van Cuong

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Determination ABO blood group is critical in human blood transfusions and organ transplantations. ABO blood group was determined using fresh sample or preserved whole blood via standard laboratory methods. The antigen or antibody is bound to a solid carrier, such as glass or plastic test tubes, glass or plastic beads, glass or plastic plates, etc., and the liquid containing the antibody or antigen to be identified is added. The trend of using "ready to use" kit in diagnosis is increasing. In order to make convenience to users, we study to make ABO blood grouping cards. The test principle is a hemagglutination test for the detection of the corresponding red cell antigens with dried antibody coated on membrane. Among various membranes, cellulose film membrane is suitable sheet for bearing the dried test sera. The card with surface layer consisting of a film cellulose was very well adapted for the purpose, showing the highest sensitivity, convenience and acceptable price. Sera used on card are standardized and have high sensitivity. Each reaction field was coated with 50µl specific monoclonal antibody. Before application to the sheet, the sera are mixed in uniform proportions with our substances, which control the osmotic pressure. In identifying ABO blood typing, the card achieved a sensitivity of 97.2% and a specificity of 100%. These disposable cards are accuracy, convenience, safety, reliable, easy to use and inexpensive.

Keywords: ABO blood group, anti-A, anti-B antigen, diagnostic card, membrane

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37568761.; Fax: +84-4-38363144; E-mail: ngatham@ibt.ac.vn