นิพนธ์ต้นฉบับ

ประสบการณ์การใช้ Elution Technique ในการวินิจฉัย ABO-HDN ในธนาคารเลือด โรงพยาบาลตำรวจ

ผกาวรรณ ชนะชัยสุวรรณ, ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช* และ วีรชัย วุฒิกรสมบัติกุล

*งานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ เขตปทุมวัน กทม. 10330, *ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัม และผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม. 10330*

บทคัดย่อ: *อาการเด็กตัวเหลืองแรกคลอดที่เกิดจากหมู่เลือด ABO ของมารดา/ทารกเข้ากันไม่ได้ (ABO hemolytic disease of newborn) มักเกิดจากมารดาหมู่เลือด O ที่ IgG anti-A และหรือ anti-B ในซีรัม ผ่านรกไปทำลายเม็ดเลือดแดงทารกหมู่เลือด A หรือ B จึงได้ทำการศึกษาผลของ elution test จากทารกแรกคลอดที่มีหมู่เลือด ABO incompatibility กับมารดา โดยเก็บตัวอย่างเลือดมารดา/ทารกที่คลอดที่โรงพยาบาลตำรวจระหว่างเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม 2541 ตรวจหมู่เลือด ABO, Rh(D), direct antiglobulin test (DAT) จากเลือดทารก indirect antiglobulin test (IAT) จากซีรัมมารดาและ heat elution test ตามวิธีใน AABB technical manual ผลการทดลองทั้งหมด 456 ราย พบมารดาหมู่ O ทารกหมู่ A หรือ B (ทารกหมู่ A 19 ราย หมู่ B 23 ราย) จำนวน 42 ราย คิดเป็น 9.2% เลือดทารกพบ DAT ให้ผลบวก 8 ราย ผลลบ 34 ราย แต่สามารถ elute antibodies ได้ทั้งหมด 31 ราย คิดเป็น 73.8% มีทารกเพียง 6 ราย เกิดภาวะ ABO-HDN โดยมีอาการตัวเหลืองและได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง ทารก 3 ราย DAT ให้ผลบวก อีก 3 ราย DAT ให้ผลลบ แต่สามารถ elute antibodies ได้จากทารกทั้ง 6 ราย ดังนั้นการทดสอบ elution test จะเป็นประโยชน์ในการวินิจฉัย HDN ที่เกิดจาก ABO incompatibility มากกว่าการตรวจ DAT*

Key Words : ● *Elution technique* ● *ABO-HDN*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2543;10:277-82.

โรคเด็กตัวเหลืองแรกคลอด (hemolytic disease of newborn, HDN) ที่เกิดจากหมู่เลือดมารดา/ทารกเข้ากันไม่ได้ ที่พบได้บ่อยมักเกิดจากหมู่เลือด ABO incompatibility โดยส่วนใหญ่มารดามักมีหมู่เลือด O และมี IgG anti-A และ/หรือ anti-B ในซีรัมผ่านรกไปจับกับเม็ดเลือดแดงของทารกหมู่ A หรือ B ทำให้เม็ดเลือดแดงของทารกถูกทำลายตั้งแต่อยู่ในครรภ์และภายหลังคลอด ปกติ anti-A และ anti-B ที่พบในคนหมู่ B หรือ A ส่วนใหญ่มักพบเป็นแอนติบอดีชนิด IgM แต่ในคนหมู่ O มักพบบางส่วนเป็นชนิด IgG ร่วมกับ

ได้รับต้นฉบับ 14 พฤศจิกายน 2543 และให้ตีพิมพ์ 28 ธันวาคม 2543
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พันตำรวจตรีหญิง ผกาวรรณ ชนะชัยสุวรรณ งานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

IgM ซึ่ง IgG แอนติบอดีนี้สามารถผ่านรกไปจับกับเม็ดเลือดแดงทารกที่มีแอนติเจนตรงกัน ทำให้เกิด ABO-HDN ได้[1] การเกิด ABO-HDN ไม่สามารถป้องกันได้ และการตั้งครรภ์ทุกครั้งก็มีโอกาสเกิดได้เช่นเดียวกัน แม้ในครรภ์แรก การตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหมู่เลือด ABO ของมารดาและทารก การตรวจ direct antiglobulin test (DAT) ของทารกเพื่อตรวจสอบการจับของ IgG แอนติบอดี รวมถึงการทำ elution test และพิสูจน์ชนิดของ IgG anti-A และ/หรือ anti-B ที่จับอยู่บนเม็ดเลือดแดงทารก เป็นกุญแจสำคัญในการวินิจฉัยภาวะ ABO-HDN อย่างไรก็ตามการเกิดภาวะ ABO-HDN ในทารกแรกคลอด ผลการตรวจ DAT ของทารกอาจให้ผลลบได้[1,2] จึงได้ศึกษาผลของการใช้ elution antiglobulin test กับ cord blood ในการช่วยวินิจฉัย HDN ที่เกิดจาก ABO incompatibility ระหว่างมารดาและทารก

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างเลือด clotted blood ของมารดา และ cord blood ของทารกแรกคลอดใส่น้ำยา EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งเก็บที่โรงพยาบาลตำรวจ ระหว่างเดือนมีนาคม-พฤษภาคม 2541 จำนวน 456 ราย

2. น้ำยา anti-A, anti-B, anti-A,B, anti-D, anti-human globulin serum, A cells, B cells, และ screening O cells จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วิธีการ

1. การตรวจหมู่เลือด :- ABO cell grouping เม็ดเลือดแดงของมารดาและทารก ทำปฏิกิริยากับ anti-A, anti-B, anti-A,B ส่วน serum grouping ตรวจเฉพาะในมารดาโดยทำปฏิกิริยากับ A cells, B cells และ O cells โดยวิธี standard tube test ตามวิธีการใช้ที่แนบมากับน้ำยาตรวจ

2. การตรวจหมู่เลือด :- Rh (D) เม็ดเลือดแดงของมารดาและทารกทำปฏิกิริยากับ anti-D โดยวิธี standard tube test ตามวิธีการใช้ที่แนบมากับน้ำยาตรวจ

3. Direct antiglobulin test (DAT)[3] ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงทารกด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายซับให้แห้ง หยด anti human globulin serum 2 หยด เขย่าและปั่นอ่านผล

4. Indirect antiglobulin test (IAT)[4] หยดซีรัมมารดา 2 หยด กับ screening cells (O1และ O2) 1 หยด incubate ที่ 37°C 30 นาที ปั่นอ่านผล ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ครั้งสุดท้ายซับน้ำเกลือให้แห้ง หยด anti human globulin serum 2 หยด เขย่าและปั่นอ่านผล

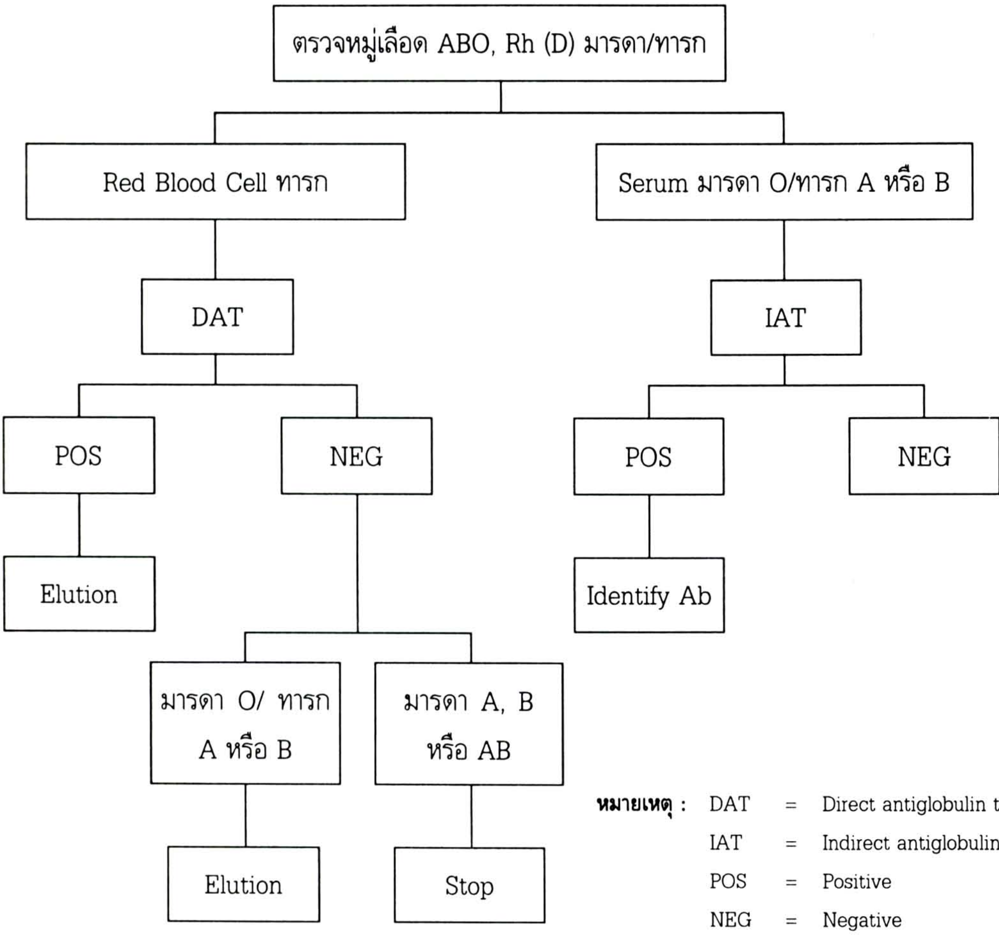
5. Heat elution technique[5] ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงทารกด้วยน้ำเกลือ 6 ครั้ง เก็บน้ำล้างเซลล์ครั้งสุดท้ายเป็นcontrol เติมน้ำเกลือลงในเซลล์ที่ล้างในปริมาณเท่ากัน นำไปเขย่าใน waterbath ที่ 56°C 10 นาที ทดสอบ eluate และ control ด้วยเซลล์ A, B, O incubate 37°C 30 นาที ทดสอบ antiglobulin test

ทำการทดสอบ serological test ต่างๆ ตามแผนผังการตรวจดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

ผลการทดลอง

จากการตรวจหมู่เลือดมารดาและทารก จำนวน 456 ราย พบมารดาหมู่เลือด O มีบุตรหมู่เลือด A หรือ B จำนวน 42 ราย คิดเป็นร้อยละ 9.2 โดยแยกเป็นมารดาหมู่เลือด O ทารกหมู่เลือด A 19 ราย มารดาหมู่เลือด O ทารกหมู่เลือด B จำนวน 23 ราย ผลการตรวจ DAT จาก cord blood ของทารก 42 รายนี้ พบ DAT ให้ผลบวก 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 19 ผลลบ 34 ราย คิดเป็นร้อยละ 81 รายที่ DAT ให้ผลบวก สามารถ elute antibody ได้ทั้งหมด 8 ราย ส่วนรายที่ DAT ให้ผลลบก็สามารถ elute antibody ได้ 23 ราย รวมเป็นทั้งหมด 31 ราย คิดเป็นร้อยละ 73.8% (ตารางที่ 1)

แผนภูมิที่ 1 ผังการตรวจ serological testing



หมายเหตุ : DAT = Direct antiglobulin test
IAT = Indirect antiglobulin test
POS = Positive
NEG = Negative

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจ cord blood จำนวน 42 ราย (9.2%) ที่เป็น ABO incompatible กับมารดาหมู่ O จากการทดสอบมารดา/ทารกทั้งหมด 456 ราย

หมู่เลือด		**DAT (ลูก)**		**Elute antibodies**	
แม่ O/ลูก A	**แม่ O/ลูก B**	**ผลบวก**	**ผลลบ**	**ผลบวก**	**ผลลบ**
19 ราย	23 ราย	8 ราย	34 ราย	31 ราย	11 ราย
4.2%	5.0%	19%	81%	73.8%	26.2%

เมื่อทดสอบ antibodies specificity ของ eluate ที่ให้ผลบวกทั้ง 31 ราย พบว่ารายที่มารดาเป็นหมู่เลือด O ทารกหมู่เลือด A จำนวน 14 ราย eluate ตรวจพบ anti-A จำนวน 8 ราย และพบ anti-A,B 6 ราย ส่วนรายที่ทารกมีหมู่เลือด B จำนวน 17 ราย eluate ตรวจพบ anti-B 12 ราย และพบ anti-A,B 5 ราย (ตารางที่ 2)

ในทารก 42 ราย ที่เป็น ABO incompatibility ไม่มีทารกรายใดต้องทำการถ่ายเลือด มีเพียง 6 ราย ที่มีอาการซีดและตัวเหลือง โดยมีค่า serum bilirubin

ตารางที่ 2 แสดงผล antibodies specificity ของ eluate ที่ให้ผลบวก จำนวน 31 ราย

DAT	Blood Group		Elution	Eluate		
	Mother	Infant	Positive	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B
Positive	O	A	4	2	-	2
Negative	O	A	10	6	-	4
Positive	O	B	4	-	3	1
Negative	O	B	13	-	9	4
	Total		**31**	**8**	**12**	**11**

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจ DAT, elution, bilirubin level ของทารก 6 ราย ที่ตัวเหลืองและได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง

No.	Blood group Infant	DAT	Eluate	Bilirubin level (mg %)
1	A	Positive	Anti-A	13.9
2	B	Positive	Anti-B	15.1
3	B	Positive	Anti-B	14.8
4	A	Negative	Anti-A	12.3
5	B	Negative	Anti-B	12.5
6	B	Negative	Anti-A,B	17.2

ตั้งแต่ 12.3-17.2 mg/dL ทั้งหมดได้รับการรักษาโดยการฉายแสง (phototherapy) มีทารก 3 รายที่ DAT ให้ผลบวก ขณะที่อีก 3 ราย DAT ให้ผลลบ แต่เลือดทารกทั้ง 6 รายสามารถ elute antibodies ได้ โดย eluate ตรวจพบเป็น anti-A 2 ราย anti-B 3 ราย anti-A,B 1 ราย (ตารางที่ 3)

จากการตรวจหมู่เลือด Rh(D) ในการทดลองนี้ พบว่ามีเพียง 1 ราย เท่านั้นที่มารดาเป็นหมู่เลือด D ลบ ทารกเป็นหมู่ D บวก แต่ DAT ของลูกให้ผลลบและ IAT ของซีรัมมารดาก็เป็นผลลบด้วย

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้มีมารดา/ทารกที่เป็น ABO incompatibility โดยมารดามีหมู่เลือด O ทารกเป็นหมู่ A หรือ B ประมาณ 9.2% ซึ่งในคนผิวขาวมีรายงานว่าพบประมาณ 15% ของการตั้งครรภ์[6] อัตราการตรวจพบ ABO-incompatibility ที่แตกต่างกันนี้ น่าจะเกิดจาก frequency ของหมู่เลือด O ในผู้ใหญ่ในเชื้อชาตินั้นๆ (ในคนผิวขาวจะหมู่เลือด O ประมาณ 45%[7] ขณะที่ในคนไทยมีหมู่เลือด O ประมาณ 38%[8]) ร่วมกับ frequency ของหมู่เลือดทารกแรกคลอด

ผลการทดสอบ cord blood ทารกพบว่ามี 8 รายที่ DAT ให้ผลบวกจากจำนวนทารก 456 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.74% ซึ่งอัตราการตรวจพบ DAT บวกในทารกแรกคลอดนี้ ใกล้เคียงกับที่โรงพยาบาลรามาธิบดีได้ทำการศึกษาไว้คือ 1.57%[9]

Hee Bong Shin และคณะ รายงาน ABO-HDN 21 ราย มีทารก DAT ให้ผลบวก 6 ราย แต่สามารถ elute antibodies ได้ทั้งหมด 19 ราย โดยได้จากทารกที่ DAT ให้ผลลบอีก 13 ราย[2] การศึกษาครั้งนี้พบ cord blood ที่ DAT ให้ผลบวก 8 ราย เป็นทารกที่เป็น ABO incompatibility ทั้งหมด ซึ่งทั้ง 8 ราย สามารถ elute IgG anti-A และหรือ anti-B จากเซลล์ทารกได้ นอกจากนี้ยังสามารถ elute antibodies ได้จากทารกที่ DAT ให้ผลลบอีก 23 ราย รวมเป็น 31 ราย (73.8%) จาก ABO incompatibility ทั้งหมด 42 ราย การที่ DAT ให้ผลลบแต่สามารถ elute antibodies ได้ อาจเนื่องจากในทารกแรกคลอด แอนติเจน A และ B ยังปรากฏบนผิวเม็ดเลือดแดงไม่เต็มที่ อีกทั้งคนหมู่ A หรือ และ B ในพลาสมา และเซลล์อื่นๆ ของร่างกายก็สามารถตรวจพบ A และ B แอนติเจนได้เช่นเดียวกับบนผิวเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถ neutralized anti-A/anti-B ที่ผ่านมาจากมารดาได้บ้าง DAT ของทารกจึงตรวจให้ผลเป็นลบได้ แต่เมื่อนำมาทำ elution ขบวนการทำ elution อาจทำให้แอนติบอดีมีความเข้มข้นขึ้น กอปรกับ eluate ที่ได้นำมาทดสอบกับเซลล์ A เซลล์ B จากผู้ใหญ่ ซึ่งมี A และ B แอนติเจนสมบูรณ์ จึงพบว่า eluate ให้ผลเป็นบวกได้ เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น

การศึกษาครั้งนี้มีทารกที่มีอาการ ABO-HDN จำนวน 6 ราย ไม่มีรายใดต้องทำการถ่ายเลือด ทารกมีอาการตัวเหลืองโดยซีรัม bilirubin สูงมากกว่า 12 mg/dL และได้รับการรักษาโดยการฉายแสงทารก 3 รายแรก DAT ให้ผลบวก อีก 3 ราย DAT ให้ผลลบ แต่ทั้งหมดสามารถ elute antibodies ได้ โดยได้ anti-A 2 ราย anti-B 3 ราย anti-AB 1 ราย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ พิมลพรรณและคณะ[9] และ Issilt และคณะ[10] ซึ่งสรุปว่า IgG anti-A และ anti-B ในมารดาหมู่ O จะเป็นสาเหตุของ ABO-HDN ได้บ่อยกว่า anti-A, B

สรุป

ภาวะเด็กตัวเหลืองแรกคลอดที่เกิดจาก ABO-HDN มักเกิดขึ้นได้บ่อยมากกว่า HDN จากระบบเลือดอื่นๆ ทั้งไม่สามารถป้องกันได้ และการตั้งครรภ์ทุกครั้งก็มีโอกาสเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกันแม้ในครรภ์แรก ความรุนแรงของโรคที่เกิดแตกต่างกัน ตั้งแต่ไม่แสดงอาการทั้งที่ตรวจพบความผิดปกติทางห้องปฏิบัติการ จนถึงขั้นรุนแรงมากจนทำให้มีอาการตัวเหลือง ซีด บวม และอาจถึงเสียชีวิตได้ การวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหมู่เลือด ABO การตรวจ DAT ของเลือดทารกอาจให้ผลบวกหรือลบได้ อย่างไรก็ตามแม้กรณีที่ DAT ให้ผลลบ ก็ยังสามารถ elute antibodies ได้ ดังนั้นการทำ elution test ในรายที่มารดา/ทารกเป็น ABO-incompatibility กัน จะเป็นประโยชน์และเป็นกุญแจสำคัญในการช่วยวินิจฉัยภาวะ ABO-HDN ได้ถูกต้องยิ่งขึ้นกว่าการตรวจ DAT เพียงอย่างเดียว

เอกสารอ้างอิง

1. *Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine, 10th ed. Oxford, England: Blackwell Science, 1997:418-21.*
2. *Hee Bong Shin, Jung Shin Lee, Mun Jeong Kim, Hyum Ok Kim, Seck Hoon Jeong. The specificity of antibodies causing ABO-Hemolytic Disease of the Newborn. Abstract from the 8th Asia-Pacific Regional Congress ISBT, 1997:61.*
3. *Virginia Vengelen-Tyler, et al. eds. Method 3.6. Direct antiglobulin test. Technical Manual 12th ed. Am Assoc Blood Bank, 1996:640-1.*
4. *Virginia Vengelen-Tyler, et al, eds. Method 3.2. Indirect antiglogulin test Technical Manual 12th ed. Am Assoc Blood Bank, 1996:631-2.*
5. *Virginia Vengelen-Tyler, et al, eds. Method 5.5. Heat Elution. Technical Manual 12th ed. Am Assoc Blood Bank, 1996:658.*
6. *Mary Louse Turgeon. Fundamentals of Immunohematology, Theory and Technique 2nd edition :*

Hemolytic Disease of the Newborn. Williams& Wilkins, A waverly Company, 1995:264.
7. Mary Louse Turgeon. Fundamentals of Immunohematology, theory and Technique 2nd ed. The ABO Blood Group System. Williams & Wilkins, A waverly Company, 1995:89.
8. รายงานประจำปี ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. 2542:141.
9. พิมลพรรณ รัตนศิริวานิช, กฤษณะ นพรัตน์, พิมล เชี่ยวศิลป์. Direct Antiglobulin test ในทารกไทยแรกคลอด. วารสารโลหิตวิทยาเวชศาสตร์บริการโลหิต 1997:7,89-92.
10. Issit PD, Combs MR. The specificity of antibodies causative of ABO HDN. Transfusion 1996;36(suppl): 23S.

Experience of Using Elution Technique in Investigation of ABO-HDN in Police General Hospital's Blood Bank

Pagawan Chanachaiwan, Tasanee Sakuldamrongpanich*, Veerachai Vutikornsombatkul

*The Department of Pathology, Police General Hospital, Pathumwan Bangkok 10330; *Antiserum and Standard Cells Preparation Section. National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330*

Abstract: *ABO hemolytic disease of the newborn (ABO-HDN) commonly occurs in mothers of blood group O because of IgG anti-A and/or anti-B may cross the placenta and destroy red blood cells of group A or B infants. In this paper, we study the results of the elution test of infants who were born to ABO incompatible mothers. Blood samples were collected from the Police General Hospital during March to May 1998. ABO, Rh (D) typing, Direct antiglobulin test (DAT), Indirect antiglobulin test (IAT) and Heat elution test were performed according to AABB technical manual. It was found that 42 (9.2%) infants (group A:19, group B:23) were born to group O mothers. Eight infants had positive DAT and 34 infants had negative DAT. However, anti-A and/or anti-B could be eluted from 31 infants (73.8%). Only 6 infants showed clinically significant ABO-HDN by developing jaundice. All patients were managed successfully with phototherapy. Of these, 3 infants had positive DAT and 3 had negative DAT. But the antibodies could be eluted from all of them. We concluded that the elution test is often more useful than the DAT in assessing HDN due to ABO incompatibility.*

Key Words : ● *Elution technique* ● *ABO-HDN*

Thai J Hematol Transf Med 2000;10:277-82.