

บทบรรณาธิการ

Rh Blood Groups

ศรีวิไล ตันประเสริฐ และ พิมล เชี่ยวศิลป์

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

การค้นพบเรื่องราวของหมู่โลหิต ABO ทำให้เชื่อว่า ปัญหายุ่งยากจากการถ่ายโลหิตได้หมดลงแล้ว และการถ่ายโลหิตมีความปลอดภัยและเป็นเรื่องธรรมดา ผู้รับโลหิตได้รับประโยชน์จากการรับโลหิตเป็นอย่างดี จนกระทั่งได้มีรายงานว่าผู้รับโลหิตบางราย มีอาการแทรกซ้อนจากการรับโลหิต ในขณะเดียวกันก็มีรายงานความผิดปกติของทารกแรกเกิด ซึ่งเกิดจากแม่ที่มีหมู่โลหิต ABO ตรงกัน มีอาการซีดเหลือง ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากแอนติบอดีตัวอื่นในโลหิตของแม่ผ่านรกมาทำลายเม็ดโลหิตแดงของลูก ปัญหาเหล่านี้หาคำอธิบายไม่ได้ จนกระทั่งเมื่อ ค.ศ. 1939 มีรายงานการค้นพบหมู่โลหิตระบบใหม่ คือ หมู่โลหิตระบบ Rh

ค.ศ. 1940 Karl Landsteiner ได้ร่วมมือกับ Alexander Wiener¹ ค้นพบหมู่โลหิตใหม่ๆ อีกหลายระบบ ซึ่งการค้นพบหมู่โลหิตที่สำคัญนี้ได้จากการทดลองฉีดกระต่ายและหนูด้วยเม็ดโลหิตแดงของลิง *Macacus "rhesus"* ทำให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีขึ้น แอนติบอดีนี้ทำปฏิกิริยากับเม็ดโลหิตแดงของคนอเมริกัน 83% มีปฏิกิริยาอ่อนหรือไม่ทำปฏิกิริยา 17% แอนติบอดีนี้จึงได้ชื่อว่า anti-rhesus และเม็ดโลหิตแดงที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีนี้ได้ชื่อว่า rhesus บวก เม็ดโลหิตแดงที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าว ได้ชื่อว่า rhesus ลบ ในภายหลังได้พบว่าแอนติบอดีที่พบในคนและสัตว์ไม่

เหมือนกันทีเดียวจึงให้ชื่อแอนติบอดีที่พบในสัตว์ทดลองว่า anti-LW เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนกับระบบหมู่โลหิต Rh ในคน

ความสำคัญของหมู่โลหิต Rh

ความสำคัญของหมู่โลหิตระบบนี้ได้รับการอธิบายโดย Levine & Stetson ในปี ค.ศ.1939² เนื่องจากพบว่าหลังจากการถ่ายโลหิตให้กับสตรีรายหนึ่งซึ่งเสียโลหิตจากการคลอดบุตรตายในครรภ์ จากการศึกษาของห้องปฏิบัติการได้พบว่าในน้ำเหลืองของนางมีแอนติบอดีซึ่งทำปฏิกิริยากับเม็ดโลหิตแดงของโลหิตหมู่ตรงกันและเม็ดโลหิตแดงของบุตร ในลักษณะเช่นเดียวกับที่ Landsteiner และ Wiener เคยรายงานไว้ แอนติบอดีในหญิงรายนี้ทำปฏิกิริยากับเม็ดโลหิตแดงของคนทั่วไปร้อยละ 83 เมื่อทำการศึกษาต่อไปพบว่าแอนติบอดีตัวนี้มีคุณสมบัติเหมือนกับแอนติบอดีที่ค้นพบโดย Landsteiner และ Wiener การค้นพบครั้งนี้ได้นำไปสู่ความรู้ความเข้าใจของปรากฏการณ์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเนื่องจากความไม่เข้ากันระหว่างโลหิตแม่และลูก (maternal/fetal blood group incompatibility)

พันธุกรรมศาสตร์ของระบบหมู่โลหิต

Rh (Basic genetics of the Rh system)

ระบบหมู่โลหิต Rh มีความซับซ้อนมากกว่าระบบหมู่โลหิต ABO ซึ่งมีแอนติเจนที่สำคัญเพียง 2 ตัวคือ A, B แอนติเจนในระบบหมู่โลหิต Rh มียีนทั้งหมด 3 คู่ คือ

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 7 มีนาคม 2542 และตีพิมพ์เมื่อ 17 มีนาคม 2542
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.ศรีวิไล ตันประเสริฐ ศูนย์บริการโลหิต
แห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Cc, Dd, Ee และมีแอนติเจนที่ตรวจได้ 5 ตัว คือ Cc, D และ Ee ยังไม่พบแอนติบอดีที่จะมาตรวจ d แอนติเจน

Rh แอนติเจน จะอยู่ด้วยกัน 3 ตัว ซึ่งจะไม่แยกจากกัน ยีน 3 ตัวนี้อาจจะอยู่รวมกันได้หลายแบบ เช่น CDe, cDE, cdE, เป็นต้น หมู่ Rh จะถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ โดยที่ยีน 3 ตัวนี้จะไม่แยกจากกัน แต่ละคนจะได้รับยีนจากพ่อ-แม่ข้างละชุดมาอยู่รวมกันเป็นคู่ ถ้าชุดที่ได้รับจากพ่อ-แม่เหมือนกัน เรียกว่า homozygous แต่ถ้าชุดที่ได้รับจากพ่อ-แม่ไม่เหมือนกัน เรียกว่า heterozygous และเนื่องจาก Rh ยีน เป็นยีนเด่นทุกตัวเท่ากันแอนติเจนที่เกิดขึ้นจะตรวจพบได้ทุกตัวบนเม็ดโลหิตแดง ในกรณีเช่นนี้ต้องเข้าใจความหมายของ homozygous "D" ว่าหมายถึง ผู้ที่มี Rh ยีนที่สามารถสร้างแอนติเจน D ได้ทั้ง 2 ชุด แต่ไม่ได้หมายความว่า Rh อื่นในทั้งสองชุดต้องเหมือนกัน เม็ดโลหิตแดงที่ทำปฏิกิริยากับ anti-D แสดงว่าเป็นหมู่โลหิต Rh บวกเม็ดโลหิตแดงที่ไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-D แสดงว่าเป็นหมู่โลหิต Rh ลบและยังไม่มี anti-D ที่จะใช้ในการตรวจเพื่อสามารถแยกได้ว่าเม็ดโลหิตแดงที่ทำปฏิกิริยากับ anti-D นั้นจะมียีนเป็น DD หรือ Dd.

Serologic testing for Rh antigen expression

เป็นการตรวจทาง Serology เพื่อดูว่าบุคคลนั้นๆ มียีนที่ encode C, -c, E และ e หรือไม่ ใช้เม็ดเลือดแดงทดสอบกับ antibodies ต่อ antigen เหล่านี้แต่ละชนิด ถ้าเม็ดเลือดแดงมีทั้ง C และ c หรือทั้ง E และ e ก็สามารถจะอนุมานได้ว่ายีนที่เป็นตัวกำหนดการแสดงออกของ antigens เหล่านั้น มีอยู่ในบุคคลนั้น ถ้าเม็ดเลือดแดงมีเฉพาะ C หรือ c หรือเฉพาะ E หรือ e บุคคลนั้นเป็น homozygous สำหรับยีนชนิดนั้นๆ การใช้ titration บางครั้งพอจะบอกถึง dose ของ antigen บางชนิดบนเม็ดเลือดแดงได้ กล่าวคือ เม็ดเลือดแดงที่เป็น homozygous ของ antigen ตัวใด มักจะมีความแรงของ antigen นั้น มากกว่าเม็ดเลือดที่เป็น heterozygous

ของ antigen ตัวนั้น สำหรับ D antigen ตรวจได้เฉพาะมีหรือไม่มี antigen ไม่สามารถใช้ titration ตรวจ dose ของ antigen ดังกล่าวได้

Weak expression of D

เม็ดเลือดแดงที่เป็น D-บวก อาจให้ผลบวกที่มีความแรงแตกต่างกันไป เมื่อทดสอบกับน้ำยาตรวจหมู่เลือด anti-D ส่วนใหญ่ เม็ดเลือดแดง D-บวก จะให้ผลบวกโดยเห็นปฏิกิริยา agglutination ชัดเจนหลังจากปั่นให้ทำปฏิกิริยากับ antisera ทำให้วินิจฉัยได้ทันทีว่าเป็น D-บวก ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ไม่ให้ผลบวกทันที ทำให้บอกชนิดได้ยาก เช่น บางครั้งต้องเพิ่มเวลา incubation กับ anti-D หรือทำ antiglobulin (AHG) test เพิ่มเติม เม็ดเลือดแดงเหล่านี้ให้ถือว่าเป็น D-บวก ซึ่งในอดีตเคยเรียกกันว่า D^u แต่ปัจจุบันนี้ไม่มีการเรียก D^u อีก แล้วเม็ดเลือดแดงที่มี D antigen ชนิดอ่อนจะถูกเรียกว่า "weak D" ถ้าใช้ monoclonal anti-D บางตัวอาจทำให้ "weak D" บางตัวเกิด direct agglutination ได้ทันทีในทางกลับกัน มันอาจไม่ทำปฏิกิริยากับ variant ของ D antigen บางชนิด

Weak D เกิดเนื่องจาก transmissible genes

ปรากฏการณ์ weak D อาจเป็นผลจากความเกี่ยวข้องกับ genetic ที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น เกิดเป็นชนิด encode weak expression ของ D antigen จะเป็นแบบอ่อนทางด้านปริมาณของ D antigen จะมีการถ่ายทอด weak D ทางพันธุกรรมตามกฎของ Mendelian dominant inheritance แบบนี้พบได้บ่อยในคนผิวดำ ซึ่งจะมี haplotype เป็น cDe ในคนผิวขาวอาจพบใน haplotype CDe หรือ cDe

ในการทดสอบกับ anti-D reagents เม็ดเลือดแดงที่เป็น weak D เนื่องจาก transmissible gene จะให้ปฏิกิริยาอ่อนมาก เมื่อทำ direct agglutination test แต่ปฏิกิริยาจะแรงขึ้น เมื่อทำต่อไปจนถึง AHG test

Weak D ชนิด position effect

Weak D ชนิดนี้เกิดจากอิทธิพลของ C gene ที่อยู่

บน chromosome เส้นตรงข้าม (trans position to D gene) ของ D gene ดังนั้นบุคคลที่มี genotype ชนิด CDe/Ce จะมี D antigen ที่อ่อนเนื่องจากถูกกดด้วย C gene ดังกล่าว ปรากฏการณ์เช่นเดียวกันอาจพบได้ในบุคคลที่มี haplotype ชนิด CDe/Ce จะมี D antigen อ่อนกว่า haplotype ชนิด CDe/ce

Partial D

เม็ดเลือดแดงที่มีบางส่วนของ D antigen ขาดหายไป แต่เดิมถูกเรียกว่า "D mosaic" หรือ "D variant" ปัจจุบันนี้ เรียกกันว่า "partial D" Lomas, McColl และ Tippet³ ได้ศึกษาและพบว่า D antigen มีจำนวน 9 epitopes เพิ่มจากที่เคยพบไว้ 7 epitopes เมื่อ ค.ศ. 1989⁴ เม็ดเลือดแดงที่มีบาง epitope ขาดหายไปอาจจะคล้ายคลึงกับ weak D ยกเว้นเมื่อได้ทดสอบกับ anti-D ที่คัดเลือกแล้ว จะให้ปฏิกิริยาแรงได้ เม็ดเลือดแดงเหล่านี้ถือว่าเป็นคุณภาพต่างจาก D ปกติ ในขณะที่เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็น weak D มี D polypeptide ที่ปกติน้อยกว่า ความแตกต่างนี้บอกด้วยปฏิกิริยาทาง serology ได้ยากมาก ยกเว้นเมื่อบุคคลที่มี epitope บางส่วนขาดหายไปแล้วมีโอกาสสร้าง anti-D ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของผู้ที่มี epitope deficiency ในส่วนอื่น ได้แรงพอๆ กับ D-บวกปกติ

ความสำคัญของ weak D ในผู้บริจาคโลหิต

การนำโลหิตชนิด weak D ไปให้แก่ผู้ป่วยที่เป็น D-บวกปกติ อาจกระตุ้นให้ผู้ป่วยสร้าง anti-D ได้ แต่มีโอกาสเกิดขึ้นจริงๆ ได้น้อย เนื่องจาก weak D มีความสามารถที่จะกระตุ้นน้อยกว่า D บวก ปกติ พบว่าในการให้ weak D จำนวน 68 ยูนิต แก่ผู้ป่วย Rh- ลบ จำนวน 45 ราย ไม่มีรายใดสร้าง anti-D ขึ้น⁵ ที่สำคัญกว่านั้นคือ ถ้าให้ weak D red cells แก่ผู้ที่มี anti-D แล้ว จะมีการทำลาย red cells นี้ได้อย่างมาก แต่อย่างไรก็ตาม weak D red cell จะถูกตรวจพบว่าเป็น D-บวก ด้วยน้ำยา anti-D ที่ใช้ในปัจจุบัน นอกจากนี้ได้เคยมีรายงานกรณี hemolytic disease of the newborn สาเหตุ

จาก weak D antigen

ความสำคัญของ Weak D ในผู้รับโลหิต

หนังสือคู่มือ AABB⁶ กำหนดให้ทดสอบเลือดผู้บริจาคให้ทราบว่าเป็น weak D หรือไม่ และถ้าใช่ก็ให้ตัดสินว่าเป็น D-บวก แต่ถ้าเป็นผู้รับโลหิตให้ตรวจ direct agglutination อย่างเดียวก็เพียงพอ ไม่ต้องทำอะไรเพิ่มเติม ถ้าให้ผลบวกก็ให้เป็น D-บวก ถ้าให้ผลลบก็ให้เป็น D-ลบ น้ำยาตรวจสมัยใหม่นี้มักจะตรวจพบ weak D เป็น D-บวก เกือบหมด มีเพียงส่วนน้อยที่ต้องตรวจต่อถึง AHG test จึงให้ผลบวก ถ้าให้ผู้รับโลหิตเหล่านี้เป็น D-ลบ โดยไม่ต้องตรวจต่อ เขาจะได้รับโลหิตชนิด D-ลบ โดยไม่มีปัญหา

ถ้ามีนโยบายที่จะตรวจผู้ป่วยว่าเป็น weak D หรือไม่ ถ้าใช่แล้วจะให้โลหิต D-บวก ต้องคอยระวังในกรณีที่ตรวจผิดพลาด เช่น ผู้ป่วย D-ลบ แต่มี DAT บวก อาจถูกแปรผลผิดเป็น weak D แล้วถูกรับโลหิต D บวก จะเสี่ยงต่อการถูกกระตุ้นให้สร้าง anti-D ดังนั้นการที่จะให้ผู้รับโลหิตเป็น D-ลบ เมื่อตรวจ direct agglutination กับ anti-D แล้ว จะปลอดภัยมากกว่า

Anti-D Reagents

High protein antisera ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบที่ทำบน slide, rapid tube หรือ microplate โดยมีส่วนผสมของโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง (20-24%) และ macromolecular additives น้ำยาเหล่านี้จะให้ผลการตรวจรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากมีไขมันหน้าไมเซลล์สูง ทำให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดโลหิตที่มี immunoglobulin เกาะอยู่หรือในผู้ที่มีสภาวะ autoimmune หรือ HDN น้ำยาที่มีส่วนผสมของ additives อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลผู้ป่วย Dลบ เป็น Dบวก และเมื่อรับโลหิต Rh บวกจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง anti-D ได้ ฉะนั้นในการตรวจแอนติเจนด้วย High protein anti-D จะต้องทำ control เม็ดโลหิตแดงที่ตรวจควบคุมไปด้วยซึ่งถ้ามีการจับกลุ่มเกิดขึ้นในหลอด control การตรวจนี้จะแปลผลไม่ได้

สาร additives ที่ใช้มีคุณสมบัติแตกต่างกันแล้วแต่บริษัทที่ผลิต ถ้าใช้ 22% หรือ 30% bovine albumin จะพบ false positive น้อยกว่า additives ตัวอื่น^{7,8}

Low Protein Antisera

ปัจจุบันมีอยู่ 3 ชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกันคือ saline reactive tube test ผลิตขึ้นโดยมีส่วนสำคัญ คือ IgM antibodies ไม่มี potentiators สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติเจนในน้ำเกลืออีกชนิดผลิตจาก IgG antibodies ซึ่งใช้สารเคมีเปลี่ยนให้มีคุณสมบัติในการจับกลุ่มได้เลยและน้ำยาตัวล่าสุด คือ Low-Protein anti-D ซึ่งเป็นการรวมของ monoclonal IgM anti-D และ polyclonal IgG anti-D

น้ำยาแต่ละชนิดมีที่ใช้แตกต่างกัน เช่น IgM anti-D จะใช้สำหรับในการตรวจแอนติเจนด้วย High Protein anti-D แล้วพบว่า control ให้ผลบวก แม้ว่าจะล้างเม็ดโลหิตแดงก่อนตรวจ สาเหตุมี immunoglobulin จับที่เม็ดโลหิตแดง ใน saline reactive antisera นี้ ปกติจะไม่มีส่วนผสมของ potentiators ใดๆ ที่จะกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดโลหิตแดง (spontaneous agglutination) และถ้ามีการเติม additives ตัวใดลงไป ผู้ผลิตต้องแจ้งรายละเอียดไว้ในคำอธิบายด้วยว่าน้ำยาชนิดนี้ไม่เหมาะในการทำ slide tests และไม่สามารถใช้ใน AHG test ได้ เพราะ IgM antibodies จะให้ปฏิกิริยาที่เร็วในการทำ AHG test สำหรับน้ำยา modified IgG Romans และคณะ⁹ ได้อธิบายว่าวิธีทำโดยใช้การเปลี่ยน raw material เป็น direct agglutinin ซึ่ง IgG antibodies จะแสดงปฏิกิริยาได้แรงกว่า IgM antibodies เหมาะสำหรับใช้ทำบน slide และทำ AGH test น้ำยาชนิดที่สามที่เตรียมจากรวม monoclonal IgM และ polyclonal IgG ได้รับการจดทะเบียนให้ใช้ในการทำ D typing น้ำยาที่ใช้ทดแทน High protein antisera หรือ modified IgG ใน rapid tube, slide หรือ

microplate tests ทั้งนี้ส่วน IgM จะทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับเม็ดโลหิตแดง D บวก และ IgG จะทำปฏิกิริยาในช่วง antiglobulin อย่างไรก็ดี แม้น้ำยาแต่ละชนิดมีที่ใช้และจุดมุ่งหมายต่างกัน แต่สิ่งซึ่งผู้ปฏิบัติการต้องระวังและปฏิบัติตามคือ ทำการทดสอบตามคำแนะนำของผู้ผลิต

เอกสารอ้างอิง

1. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol NY* 1940;43:223.
2. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intragroup agglutination. *JAMA* 1939;113:126-7.
3. Lomas C, McColl K, Tippet P. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category D11 cells with monoclonal anti-D. *Transfus Med* 1993;3:67-9.
4. Lomas C, Tippet P, Thompson KM, et al. Demonstration of seven epitopes of the Rh antigen D using monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang* 1989;57:261-4.
5. Schmidt PJ, Morrison EG, Shohl J. The antigenicity of the Rh. D^u blood factor. *Blood* 1962;20:196-202.
6. Klein HG, ed. Standards for blood banks and transfusion services. 17th ed. Bethesda MD : American Association of Blood Banks, 1996.
7. White WD, Issitt CH, McGuire D. Evaluation of the use of albumin controls in Rh typing. *Transfusion* 1974;14:67-71.
8. Reid ME, Ellis SS, Frank BA. Another potential source of error in Rh-typing. *Transfus* 1975;15:485-8.
9. Romans DG, Tilley CA, Crookston MC, Falk RE, Dorington JK. Conversion of incomplete antibodies to direct agglutinins by mild reduction: evidence for segmental flexibility within the Fc fragment of immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2531-5.