

นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา anti-D ในการตรวจหมู่โลหิต RhD

ทัศนีย์ สกุลดำรงคัพานิช, จินตนา ทับรอด, สารีกา แสงกล้า และ อุดม ตั้งต้อย

ฝ่ายเตรียมน้ำยาแอนติซีรัม ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ : ได้ทำการศึกษาน้ำยา anti-D ทั้งหมดจำนวน 11 ตัวอย่างจาก 10 บริษัทและที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อดูประสิทธิภาพในการใช้ตรวจหมู่โลหิต Rh(D) โดยศึกษาหาความแรง ความเร็ว ความจำเพาะ และความสามารถในการตรวจเซลล์ weak D antigen และเซลล์ DVI พบว่าน้ำยา anti-D ทั้งหมดให้ผลความแรงและความเร็วได้มาตรฐานตามที่ WHO กำหนด คือ มีความแรงมากกว่า 1:64 กับเซลล์ R1r และความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาให้เห็นภายใน 60 วินาทีด้วยวิธี slide test น้ำยา anti-D ส่วนใหญ่ สามารถตรวจเซลล์ weak D antigen จำนวน 20 ตัวอย่างได้ทั้งหมด สำหรับเซลล์ DVI จำนวน 7 ตัวอย่าง น้ำยา anti-D จาก 2 บริษัทไม่สามารถตรวจเซลล์ DVI ได้เลย ขณะที่อีก 2 บริษัท สามารถตรวจเซลล์ DVI ได้ทันทีที่อุณหภูมิห้อง anti-D อีก 6 บริษัทรวมทั้งของศูนย์บริการโลหิตฯ ต้องตรวจด้วยวิธี Indirect antiglobulin test (IAT) จึงจะตรวจเซลล์ DVI ได้ โดยสรุปน้ำยา anti-D จากบริษัทต่างๆ จะมีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ weak D และ DVI แตกต่างกันไปและยังพบว่าเซลล์เหล่านี้บางเซลล์ให้ผลการตรวจเป็น Rh(D) บวก ด้วยน้ำยาจากบริษัทหนึ่งแต่ให้ผลเป็น Rh(D) ลบ จากน้ำยาอีกบริษัทได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา anti-D เพื่อคัดเลือกให้เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรวจ Rh(D) ของผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย

Key Words : ● Anti-D ● Rh (D) typing

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2542;9:39-48.

เป็นเวลามากกว่า 50 ปีแล้ว ที่มีรายงานการค้นพบหมู่โลหิต Rh(D) จากสาเหตุของทารกแรกคลอดตายในครรภ์ ที่เกิดจากการขาดหมู่โลหิต Rh(D) negative¹ นับจากนั้นมาความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหมู่โลหิตนี้มีมากขึ้น ทำให้ทราบว่าเป็นหมู่โลหิตที่มีความซับซ้อนมาก ในปี 1946 มีรายงานการพบเม็ดเลือดแดงที่ทำปฏิกิริยากับ anti-D แล้วให้ผลอ่อนกว่า Rh(D) บวกปกติ เรียกว่า D^u

เข้าใจว่าเกิดจากการมีปริมาณ D แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ (quantitative defect)² และในปี 1953 ก็มีรายงานการพบ anti-D ในซีรัมผู้ป่วยที่มีเซลล์ D บวก³ ต่อมาพบว่า D แอนติเจนเป็น mosaic แอนติเจน⁴ ดังนั้นผู้ป่วยที่ขาดบางส่วนของ D แอนติเจน (qualitative defect) เมื่อได้รับเลือดที่เป็น D บวกปกติจะสามารถสร้าง anti-D ต่อส่วนที่ตนเองขาดได้ เรียกว่า D variant ต่อมานิยมเรียกเม็ดเลือดแดงที่มีปริมาณ D แอนติเจนน้อยกว่าปกติ D^u ว่า weak D และเม็ดเลือดแดงที่ขาดบางส่วนของ D แอนติเจน D variant ว่า

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2541 และให้ตีพิมพ์เมื่อ กุมภาพันธ์ 2542
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ น.ส.ทัศนีย์ สกุลดำรงคัพานิช ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม. 10330

Partial D⁵ ในการตรวจหมู่โลหิต Rh(D) ว่าเป็น D บวก D ลบ หรือ weak D นั้น ขึ้นอยู่กับน้ำยา anti-D ที่ใช้ และวิธีการที่ใช้ทดสอบ ในอดีตน้ำยา anti-D ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็น polyclonal antibody เตรียมจากซีรัมของผู้ป่วย D ลบ หรือมารดา D ลบ ที่สร้าง anti-D จากการรับเลือดหรือตั้งครรภ์ที่เป็น D บวก และนำมาเตรียมเป็น high protein anti-D หรือ modified IgG anti-D เม็ดเลือดแดงที่ทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับ anti-D นี้ที่อุณหภูมิห้อง แปลผลเป็น D บวก ส่วนพวกเซลล์ weak D หรือ partial D จะต้องทดสอบเพิ่มเติม เช่น ใช้ indirect antiglobulin test หรือ enzyme เทคนิคจึงจะเกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เม็ดเลือดแดงที่ให้ผลลบกับวิธีที่กล่าวมาทั้งหมด จึงถือเป็น D ลบ ต่อมาเมื่อซีรัมจากคนที่จะนำมาผลิตเป็น polyclonal anti-D หายากขึ้น พร้อมกับเทคโนโลยีในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีได้พัฒนาขึ้น จึงมีความเพียรพยายามที่จะผลิต human monoclonal anti-D จนมีรายงานการผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่คงทนที่ผลิต anti-D ทั้งชนิด IgM และ IgG ได้เป็นผลสำเร็จจำนวนมาก^{6,7} และได้เริ่มนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแทนน้ำยา polyclonal เดิม โดยมีทั้งที่เป็น monoclonal อย่างเดียวหรือเป็น blend ของ monoclonal/polyclonal antibody ซึ่งให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาได้แรงและเร็วเทียบเท่าหรือดีกว่าการใช้น้ำยา polyclonal antibody ในการตรวจหมู่เลือด Rh(D) อย่างไรก็ตามน้ำยา monoclonal anti-D ที่บริษัทต่างๆ ผลิตในระยะแรกมีประสิทธิภาพแตกต่างกันในการตรวจเซลล์ weak D และ partial D ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่สามารถตรวจเซลล์ DVI ได้เลย^{8,9} เนื่องจากเซลล์ DVI เป็น partial D ที่มี epitope D แอนติเจนขาดหายไปมากที่สุด อีกทั้งขาด epitope สำคัญที่มีความเป็น immunogenicity มากที่สุดคือ ep 6/7 จากจำนวน 9 epitopes ของ D แอนติเจน¹⁰ จากการทำ cross-testing โดยใช้เซลล์และซีรัมของ partial D ที่สร้าง anti-D สามารถแยก partial D ออกเป็น 7 categories คือ D

categories I-VII¹¹ ต่อมา DI ถูกยกเลิกไป และก็มีรายงานการสร้าง anti-D ขึ้นใน D categories เหล่านี้¹² ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาการผลิตโมโนโคลนัล anti-D ให้สามารถตรวจได้ครอบคลุมทุก epitope ของ D แอนติเจน

ในปี 1990 ที่ประชุม 2nd International workshop¹³ มีรายงานการผลิต monoclonal anti-D ใหม่ๆ อีกมากมาย ที่มีความจำเพาะครอบคลุม epitope ต่างๆ ของ D แอนติเจน ได้มากขึ้น และนำมาพัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตให้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้ทำการทดสอบน้ำยา anti-D ที่ขายในท้องตลาด รวมทั้ง monoclonal anti-D ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยทดสอบดูความแรง (potency) ความเร็ว (avidity) ความจำเพาะ (specificity) และความสามารถในการตรวจเซลล์ weak D และ partial D โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ DVI เพื่อความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหมู่โลหิต D ทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

น้ำยา anti-D จำนวน 11 ตัวอย่าง

Blend of monoclonal IgM and polyclonal IgG anti-D sera

C1 :- Bioclone, Ortho Diagnostic Systems, USA.

C2 :- Immurcor, Immucor INC, USA

C3 :- Novaclone, Dominion Biologicals Ltd, Canada

Human monoclonal IgM and IgG anti-D sera

C4 :- Gamma (IgM/IgG), Gamma Biologicals, Inc, USA

C5 :- Seraclone (IgM/IgG), Biotest AG, Germany

- C6 :- Epiclone (IgM/IgG), CSL Limited, Australia
- C7 :- Avidity anti-D (IgM/IgG), Bioscot Limited, United Kingdom
- C8 :- Totem (IgM/IgG), Diagast Laboratories, France
- C9 :- Transclone (IgM+potentiator), Diagnostics Pasteur, France
- C10 :- Monoclonal anti-D (IgM/IgG), ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
- C11 :- Anti-D(Rho) IgM, Span Diagnostics Ltd, India.

วิธีการ

1. การหาความแรงของ anit-D (potency test) การทดสอบทำตามคำแนะนำของ AABB Technical Manual 12th edition เจือจางน้ำยา anti-D โดยทำ two-fold dilution ด้วย phosphate buffer saline ที่มี 1% bovine albumin ผสมอยู่ นำ diluent ต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับเซลล์ pool R1r (cDe/cde) จำนวน 2 คน ปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้อง นำไป incubate 37 °C 30 นาที และทำ indirect antiglobulin test โดยใช้ anti-globulin serum ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย อ่านความแรงเป็น titer ที่ dilution สูงสุดที่เกิดปฏิกิริยาให้เห็นรวมทั้งอ่านคะแนนความแรงรวมเป็น score ด้วย¹⁴

2. การหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาด้วยวิธี slide test (avidity test) การทดสอบทำตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยใช้ anti-D 1 หยด ผสมกับ 40% เซลล์ R1r และ Rh(D) บวก ทัวไป 1 หยด บน slide คนให้เข้ากันจับเวลาเมื่อเม็ดเลือดแดงเริ่มจับกลุ่มให้เห็น เป็น avidity time และอ่านความแรงของปฏิกิริยาเมื่อครบ 2 นาที

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) โดยให้ทำปฏิกิริยากับเซลล์ต่างๆ คือ เซลล์ R0r, R1r, R2r,

A(rr), A(ir'), B(rr), B(ir'), O(rr), O(ir') O(ir'') การทดสอบทำตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยหยด anti-D 1 หยด กับ 1 หยดของ 3% เซลล์เม็ดเลือดแดงลงในหลอดทดลอง ปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้อง เมื่อผลการทดสอบให้ผลลบ นำไป incubate 37 °C 15 นาที และทำ indirect antiglobulin test

4. การทดสอบความสามารถในการตรวจเซลล์ weak D และเซลล์ DVI ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยใช้เซลล์ weak D จำนวน 20 รายและเซลล์ DVI จำนวน 7 รายซึ่งเซลล์เหล่านี้ทั้งหมดเป็นเซลล์ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี indirect antiglobulin test เมื่อทดสอบกับน้ำยา polyclonal anti-D ในอดีต โดยเฉพาะเซลล์ DVI นั้นได้ทดสอบ โดยใช้ น้ำยาชุด D screen ของบริษัท Diagast

ผลการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงความแรงของน้ำยา anti-D ทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่ามีความแรงแตกต่างกัน โดยเมื่ออ่านปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องมีความแรงต่ำสุดที่ titer 1:128 และให้ score รวม 71 และ 76 คะแนน (C2,C4) จนถึงสูงสุดที่ titer 2,048 และ score รวม 122 และ 120 คะแนน (C7,C8) ส่วนปฏิกิริยาที่ indirect antiglobulin test มี titer ต่ำสุด 1,024 และผล score รวม 96 คะแนน (C4), titer สูงสุด คือ 4,096 และผล score รวม 124, 121, 120 คะแนน (C5, C6 และ C7) อย่างไรก็ตามน้ำยาทั้ง 11 ชนิด ได้มาตรฐานตาม WHO กำหนด คือ มีความแรงมากกว่า 64 กับเซลล์ R1r เมื่ออ่านที่อุณหภูมิห้อง

ตารางที่ 2 แสดงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาให้เห็นเมื่อ anti-D ทำปฏิกิริยากับเซลล์ Rh(D) บวก และเซลล์ R1r โดยวิธี slide test พบว่าน้ำยาทั้ง 11 ตัวอย่างได้มาตรฐานตาม WHO กำหนด คือ เกิดปฏิกิริยาให้เห็นภายในเวลา 60 วินาที โดยน้ำยา anti-D ส่วนใหญ่จะเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ให้เห็นโดยเฉลี่ยภายในเวลา 15 วินาที และ

ตารางที่ 1 แสดงความแรงของ anti-D จากบริษัทต่างๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ R1r โดยอ่านปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง (a) และที่ indirect antiglobulin test (b)

Anti-D	Titre	Score	Titre end 4+at IS
C1	a) 256	88	16
	b) 2,048	104	
C2	a) 256	71	8
	b) 2,048	102	
C3	a) 256	93	32
	b) 2,048	102	
C4	a) 128	76	8
	b) 1,024	96	
C5	a) 512	103	32
	b) 4,096	124	
C6	a) 512	101	32
	b) 4,096	121	
C7	a) 2,048	122	64
	b) 4,096	120	
C8	a) 2,048	120	32
	b) 4,096	110	
C9	a) 1,024	111	16
	b) 2,048	109	
C10	a) 512	110	32
	b) 2,048	107	
C11	a) 512	108	16
	b) -	-	

IS = immediate spin; - = Not tested

มีความแรงมากกว่า 2 บวก เมื่อเวลาครบ 2 นาที ยกเว้น น้ำยา C2 และ C6 เกิดปฏิกิริยาให้เห็นเมื่อเวลาโดยเฉลี่ย ประมาณ 34 และ 28 วินาทีกับเซลล์ R1r และ 25 และ 15 วินาทีกับเซลล์ Rh D บวก ตามลำดับ และเมื่อเวลา ครบ 2 นาที ให้ความแรงบน slide ไม่เกิน 2 บวก

ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า anti-D ทั้ง 11 ตัวอย่าง

มีความจำเพาะกับ D แอนติเจนเนื่องจากให้ผลบวกกับ เซลล์ที่มี D แอนติเจน คือ R0r, R1r, R2r และ ให้ผลลบ กับเซลล์ที่ไม่มี D แอนติเจนทั้งหมด คือ rr, rr', rr" ทั้งที่เป็นหมู่โลหิต A, B และ O

ตารางที่ 4 แสดงปฏิกิริยาของน้ำยา anti-D ชนิด ต่างๆ กับเซลล์ weak D แอนติเจนและเซลล์ DVI พบ ว่าน้ำยา anti-D ของตัวอย่าง C1-C8 และ C10 ซึ่งเป็น blend ของ IgM และ IgG anti-D สามารถตรวจเซลล์ weak D แอนติเจน ของตัวอย่างเลือดที่ตรวจทั้งหมด คือ ตรวจได้ 100% ขณะที่ anti-D C9 ซึ่งเป็น IgG+ Potentiator สามารถตรวจเซลล์ weak D แอนติเจนได้ 17 ราย จาก 27 ราย (74.0%) และ anti-D C11 ซึ่งเป็น IgM ตรวจได้เพียง 12 รายใน 27 ราย (44.4%) และพบว่า น้ำยาแต่ละตัวอย่างให้ผลบวกกับเซลล์ต่างๆ แตก ต่างกันไป คือ บางตัวอย่างสามารถตรวจเซลล์ weak D และ เซลล์ DVI ได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง ขณะที่บางตัวอย่าง ต้องใช้ antiglobulin test จึงจะเห็นปฏิกิริยา และ anti-D ของแต่ละตัวอย่างยังให้ผลของความแรงของปฏิกิริยา ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอีกด้วยทำให้สามารถแปลผลเซลล์ weak D No 1-10 เป็น Rh D บวก เพราะให้ผลบวกที่ อุณหภูมิห้อง ส่วนเซลล์ weak D No 11-20 รวมทั้ง เซลล์ DVI anti-D ส่วนใหญ่ที่ศึกษาสามารถแปลผลเป็น weak D เนื่องจากให้ผลบวกที่ antiglobulin test ยกเว้นตัวอย่าง C9 และ C11 แปลผลเป็น Rh(D) ลบกับ เซลล์ weak D บางเซลล์รวมทั้งเซลล์ DVI ทั้งหมด

ตารางที่ 5 แสดงถึงประสิทธิภาพของน้ำยา anti-D ในการแปลผลเซลล์ weak D และ DVI ทั้ง 27 ตัวอย่าง โดย C1-C6 และ C10 แปลผลเป็น weak D ร้อยละ 55.6-70.4 แปลผลเป็น Rh(D)บวก ร้อยละ 44.4-29.6 C7 และ C8 แปลผลเป็น เซลล์ weak D ร้อยละ 26.0 และ 7.5 เป็น Rh(D)บวก ร้อยละ 70.4 และ 92.5 ตาม ลำดับ C9 แปลผลเป็น weak D ร้อยละ 26.0, เป็น Rh(D)บวก ร้อยละ 37.0 และ Rh(D) ลบ ร้อยละ 37.0 ส่วน C10 แปลผลเป็น Rh(D) บวก ร้อยละ 44.4 และ Rh(D)ลบ ร้อยละ 55.6 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงความเร็วเป็นวินาที (avidity time) ที่เริ่มเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เมื่อน้ำยา anti-D ทำปฏิกิริยากับเซลล์ Rh(D) บวก และ R1r และแสดงความแรง (grading) ของปฏิกิริยาเมื่อเวลาครบ 2 นาที

Anit-D	R1r (n=6)		Rh D+ve (n=20)	
	Time (sec) (x̄)	grading at 2'	Time (sec) (x̄)	grading at 2'
C1	12	2+ → 2S	7	1S → 3
C2	34	1+ → 1+	25	1+ → 1S
C3	6	2S → 3+	5	2+ → 3S
C4	8	2+ → 2S	6	2+ → 3S
C5	12	2+ → 3+	8	1S → 3+
C6	28	1+ → 2+	15	1+ → 2+
C7	11	3+ → 4+	5	2+ → 3S
C8	8	2+ → 3S	4	2+ → 3S
C9	10	2+ → 3S	5	2+ → 4+
C10	14	2+ → 3S	9	2+ → 3S
C11	8	2+ → 3S	5	2+ → 4+

หมายเหตุ : อ่านผลความแรงตาม AABB technical Manual 12th edition¹⁴

S = Strong reaction

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะของน้ำยา anti-D กับเซลล์ Rh (D) บวก และ Rh (D) ลบ phenotype ต่างๆ โดยอ่านปฏิกิริยาทันทีที่อุณหภูมิห้อง (RT) และโดย indirect antiglobulin test(IAT)

Anti-D	A(rr)		A(rr')		B(rr)		B(rr')		O(rr)		O(rr')		O(rr'')		Ror		R1r		R2r	
	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT
C1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	
C11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4+		4+		4+	

หมายเหตุ : + = Positive reaction

0 = Negative reaction

ตารางที่ 4 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง anti-D ชนิดต่างๆ กับเซลล์ weak D จำนวน 20 ตัวอย่าง (1-20) และเซลล์ DVI จำนวน 7 ตัวอย่าง (21-27)

Cell No.	C1		C2		C3		C4		C5		C6		C7		C8		C9		C10		C11	
	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT	RT	IAT
1	1+	2+	1+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	3+	1+	2+	1+	2+	1+	2+	1+	1+	1+	2+	2s	-
2	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	1+	w	-
3	w	4+	w	1+	4+	3+	3+	4+	3+	4+	2+	4+	3+	3+	3+	4+	3+	3+	2+	4+	4+	-
4	w	4+	w	4+	1+	3+	2+	4+	1+	4+	w	4+	1+	4+	2+	3+	2+	3+	1+	3+	2+	-
5	1+	3+	1+	3+	2+	3+	1+	3+	2+	4+	1+	3+	2+	3+	2+	3+	2+	2+	1+	4+	2+	-
6	w	2+	w	3+	w	2+	w	3+	w	4+	w	4+	w	3+	w	3+	w	1+	w	3+	w	-
7	1+	3+	2+	3+	4+	3+	3+	4+	3+	4+	2+	4+	4+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	-
8	w	1+	w	1+	w	1+	1+	1+	w	1+	w	3+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	w	1+	1+	-
9	0	3+	0	3+	4+	2+	2+	3+	1+	4+	w	4+	2+	3+	2+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	-
10	0	3+	w	3+	2+	3+	w	3+	1+	3+	w	4+	1+	4+	2+	4+	2+	1+	w	3+	2+	-
11	0	3+	0	2+	w	2+	0	3+	0	4+	w	3+	0	3+	w	2+	0	1+	0	2+	w	-
12	0	2+	0	2+	w	2+	w	4+	0	4+	0	2+	w	4+	3+	4+	0	2+	0	4+	2+	-
13	0	1+	0	1+	0	1+	0	2+	0	2+	0	2+	0	2+	0	w	0	w	0	w	0	-
14	0	1+	0	w	0	w	0	2+	0	2+	0	2+	0	1+	0	w	0	1+	0	w	0	-
15	0	4+	0	4+	0	2+	0	4+	0	4+	0	3+	1+	4+	4+	3+	0	1+	0	4+	0	-
16	0	2+	0	2+	0	2+	0	4+	0	4+	0	1+	0	4+	2+	4+	0	0	0	3+	0	-
17	0	1+	0	1+	0	1+	0	4+	0	3+	0	1+	w	4+	2+	1+	0	w	0	4+	0	-
18	0	1+	0	1+	0	1+	0	4+	0	3+	0	1+	w	3+	1+	1+	0	w	0	3+	0	-
19	0	1+	0	1+	0	1+	0	4+	0	2+	0	1+	w	4+	1+	1+	0	0	0	3+	0	-
20	0	1+	0	1+	0	1+	0	4+	0	4+	0	1+	0	4+	4+	3+	0	0	0	4+	0	-
21	0	3+	0	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	3+	1+	4+	4+	3+	0	0	0	4+	0	-
22	0	3+	0	3+	0	2+	0	4+	0	4+	0	1+	2+	4+	3+	4+	0	0	0	3+	0	-
23	0	3+	0	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	1+	2+	4+	4+	4+	0	0	0	3+	0	-
24	0	3+	0	2+	0	2+	0	4+	0	4+	0	1+	w	4+	3+	3+	0	0	0	4+	0	-
25	0	3+	0	2+	0	2+	0	4+	0	4+	0	4+	0	4+	3+	2+	0	0	0	4+	0	-
26	0	4+	0	2+	0	4+	0	4+	0	4+	0	2+	0	4+	4+	4+	0	0	0	3+	0	-
27	0	3+	0	3+	0	3+	0	4+	0	4+	0	2+	1+	4+	4+	4+	0	0	0	4+	0	-

หมายเหตุ : + = Positive reaction w = Weak reaction
0 = Negative reaction - = Not tested

ตารางที่ 5 แสดงประสิทธิภาพในการแปลผลหมู่โลหิต RhD เมื่อใช้น้ำยา anti-D ชนิดต่างๆ ในการตรวจเซลล์ weak D และ เซลล์ DVI ทั้ง 27 ตัวอย่าง

Anti-D การแปลผล	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
weak D(%)	70.4	66.7	55.6	59.3	63.0	59.3	26.0	7.5	26.0	63.0	-
Rh D+(%)	29.6	33.3	44.4	40.7	37.0	40.7	74.0	92.5	37.0	37.0	44.4
Rh D-(%)	-	-	-	-	-	-	-	-	37.0	-	55.6

- Rh D+ เกิดปฏิกิริยากับ anti-D ที่อุณหภูมิห้อง
- Rh weak D เกิดปฏิกิริยากับ anti-D ที่ anti globulin test
- Rh D- ไม่เกิดปฏิกิริยากับ anti-D ที่ภาวะใดเลย

วิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่าน้ำยา anti-D ทั้ง 10 ชนิด รวมทั้งของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (C10) ให้ผลในการตรวจหมู่โลหิต D ทั้งความแรง ความเร็ว และความจำเพาะ ได้มาตรฐานตามที่ WHO กำหนด โดยผลของแต่ละตัวอย่างจะแตกต่างกันไปบ้าง

สำหรับความสามารถในการทำปฏิกิริยากับเซลล์ weak D แอนติเจนและเซลล์ D VI ทั้ง 27 ตัวอย่าง น้ำยา anti-D C1-C8 และ C10 ซึ่งเป็น IgM/IgG blend สามารถตรวจเซลล์เหล่านี้ได้ทั้งหมด แสดงว่าน้ำยา anti-D โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมโนโคลนัล IgM/IgG blend ได้มีการพัฒนาขึ้นจนสามารถตรวจเซลล์ DVI ได้แล้ว เนื่องจากเคยมีการศึกษาแล้วพบว่าน้ำยาดังกล่าวไม่สามารถตรวจเซลล์ DVI ได้เลย^{8,9} นอกจากนี้น้ำยาโมโนโคลนัล anti-D นี้ยังสามารถตรวจพบเซลล์ weak D บางเซลล์ได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเซลล์เหล่านี้เคยให้ผลบวกกับน้ำยา anti-D ชนิดโพลีโคลนัล เฉพาะที่ antiglobulin test เท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ weak D No1-10 น้ำยา anti-D เกือบทุกตัวอย่างสามารถตรวจได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง แสดงว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D มีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ weak D ได้ดีกว่าโพลีโคลนัล anti-D ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sonneborn¹⁵ ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาโพลีโคลนัลและโมโน

โคลนัล anti-D ในการทำปฏิกิริยากับเซลล์ weak D ต่างๆ ดังนั้นพวกเซลล์ high grade D^u ในอดีต จะแปลผลเป็น D บวก กับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D ได้และสามารถรับเลือด D บวกปกติได้อย่างปลอดภัย สำหรับเซลล์ weak D No. 11-20 และเซลล์ DVI ทั้ง 7 ตัวอย่าง น้ำยา anti-D IgM/IgG blend ชนิด C1-C6 และ C10 สามารถตรวจเป็นเซลล์ weak D คือ ให้ผลที่ antiglobulin test แต่ C7 และ C8 ทำปฏิกิริยากับเซลล์เหล่านี้บางเซลล์ แปลผลเป็น D บวก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง C8 กับเซลล์ DVI ทั้งหมด สามารถแปลผลเป็น D บวก ปกติ ซึ่งจะเกิดผลเสียได้ เนื่องจากถ้าน้ำยานี้ไปตรวจผู้ป่วย DVI หรือ weak D แล้วแปลผลเป็น D บวก เมื่อผู้ป่วยรับเลือด D บวกปกติ สามารถถูกกระตุ้นให้สร้าง anti-D ได้ ดังมีรายงานผู้ป่วย partial D (D variant) ต่างๆ เมื่อได้รับเลือด D บวก สามารถสร้าง anti-D ต่อ epitopes ที่ขาดหายไปได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ที่เป็นเซลล์ DVI ซึ่งเป็น partial D ที่สร้าง anti-D ที่มีรายงานมากที่สุด โดยพบในหญิงตั้งครรภ์ที่เป็น DVI และมี anti-D ซึ่งทำให้บุตรคนต่อมามีอาการตัวเหลืองหลังคลอดรุนแรง รวมทั้งมีรายงานการสร้าง anti-D ในผู้ป่วย partial D อื่นๆ เช่น DFR, DBT, Rho^{Har} เป็นต้น ซึ่งเซลล์เหล่านี้รวมทั้งเซลล์ DVI เป็น partial D ที่มี D แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงน้อยและขาด epitopes

ที่สำคัญของ D แอนติเจน คือ ep6/7¹⁶ ส่วนน้ำยาบริษัท C9 และ C11 ตรวจเซลล์ weak D No. 11-20 บางเซลล์ และเซลล์ DVI ทั้งหมดแปลผลเป็น D ลบ ในกรณีนี้ถ้าแปลผลในผู้ป่วยจะไม่ใช่ปัญหา เนื่องจากผู้ป่วยจะได้รับเลือด D ลบ ผู้ป่วยก็ไม่เสี่ยงต่อการถูกกระตุ้นให้สร้าง anti-D แต่น้ำยานี้อาจไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจผู้บริจาคโลหิต เนื่องจากเมื่อแปลผล weak D และ DVI เป็น D ลบ โลหิตนี้จะถูกนำไปให้แก่ผู้ป่วย D ลบ ซึ่งอาจจะกระตุ้นให้ผู้ป่วย D ลบ สร้าง anti-D ได้ ซึ่งก็มีรายงานการสร้าง anti-D ในผู้ป่วย D ลบ ที่ได้รับเลือด weak D ที่ label เป็น D ลบ¹⁷ อีกทั้งมีรายงานว่า มารดา D ลบ สามารถสร้าง anti-D จากการถูกกระตุ้นด้วยบุตรที่เป็นเซลล์ D^{va}¹⁸ และถึงจะไม่เคยมีรายงานว่าเซลล์ DVI กระตุ้นให้ผู้ป่วย D ลบ สร้าง anti-D แต่ก็ยังไม่เคยมีการพิสูจน์ว่าการได้รับเลือด DVI ปริมาณมากๆ จะไม่กระตุ้นให้สร้าง anti-D ขึ้นได้ ดังนั้นน้ำยา anti-D ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจผู้ป่วย หญิงตั้งครรภ์ และผู้บริจาคโลหิตจึงควรเป็นน้ำยา anti-D ชนิด IgM/IgG blend โดย anti-D IgM นี้ควรจะทำปฏิกิริยากับเซลล์ D บวก และ partial D ที่ขาด D epitope เพียงเล็กน้อย เช่น D^v ได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง ทันทันที่ที่อ่านค่าคือเป็น direct agglutination ส่วน anti-D IgG ก็ควรจะทำปฏิกิริยากับ partial D ที่ขาด D epitope มากๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DVI ได้ที่ antiglobulin test เท่านั้น ซึ่งเมื่อนำน้ำยานี้ไปตรวจในผู้บริจาคโลหิตก็ควรตรวจจนถึง antiglobulin test ผู้บริจาคที่ให้ผลบวกทันทีที่อ่านค่าที่อุณหภูมิห้อง และ/หรือที่ antiglobulin test ให้ label ผู้บริจาคโลหิตนั้นเป็นหมู่ Rh(D) บวก ถ้าให้ผลลบจนถึง antiglobulin test ให้แปลผลผู้บริจาคโลหิตนั้นเป็นหมู่ Rh(D) ลบ ถ้านำน้ำยานี้ไปใช้ตรวจผู้ป่วย ควรจะตรวจโดยอ่านค่าทันทีที่อุณหภูมิห้อง ถ้าได้ผลบวกให้แปลผลผู้ป่วยเป็น Rh(D) บวก ถ้าได้ผลลบก็ให้แปลผลเป็น Rh(D) ลบ โดยไม่ต้องทำ antiglobulin test เพื่อให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้ป่วยในการรับเลือด เนื่องจากถ้าทำ

antiglobulin test ในผู้ป่วยต่ออาจแปลผลผิด ถ้าผู้ป่วยมี direct coombs' test ให้ผลบวกอยู่แล้ว ซึ่งเป็นไปตามคำแนะนำใน safe blood and Blood Product Module 3 Blood Group Serology ของ WHO¹⁹

สรุป

น้ำยา anti-D ชนิด C1-C6 รวมทั้งของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจหมู่โลหิต D ทั้งผู้ป่วย, หญิงตั้งครรภ์และผู้บริจาคโลหิต เพราะทำปฏิกิริยากับเซลล์ DVI ที่ anti-globulin test เท่านั้น ส่วน anti-D ชนิด C7, C8 นำไปตรวจหมู่โลหิต D ในผู้บริจาคได้แต่ไม่เหมาะสมที่จะนำไปตรวจผู้ป่วยและหญิงตั้งครรภ์ เนื่องจากจะแปลผลเซลล์ DVI เป็น D บวก สำหรับ anti-D ชนิด C9 และ C11 นำไปใช้ตรวจผู้ป่วยได้ แต่อาจจะไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจในผู้บริจาคโลหิต เนื่องจากจะแปลผลเซลล์ DVI และ weak D บางเซลล์เป็น D ลบ ดังนั้นการเลือกใช้ anti-D จึงมีความจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกให้เหมาะสมเพื่อสามารถนำมาใช้ตรวจ Rh(D) ได้ทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต

เอกสารอ้างอิง

1. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intragroup agglutination. *JAMA* 1939;113:126-7.
2. Stratton F. A new allelomorph. *London : Nature* 1946; 158:25-6.
3. Argall CI, Ball JM, Trentelman E. Presence of an anti-D antibody in the serum of Du patient. *J Lab Clin Med* 1953;41:495-8.
4. Weiner As, Unger LJ. Rh factors related to the Rho factor as a source of clinical problem. *JAMA* 1959;169: 696-9.
5. Technical Manual. 12th ed. Virginia : Vengelen-Tyler. *Am Asso Blood Banks* 1996;255-74.
6. Thompson KM, Tolliday B, Hamblin L and Hughes-Jones NC. The production of Human Monoclonal Antibodies against the D antigen of the Rh system.

- Biotest Bulletin* 1989;4:19-22.
7. McCann MC, James K, Kumpel BM. Production and use of human monoclonal anti-D antibodies. *J Immunol Methods* 1988;115:3-15.
 8. Van Rhenen DJ, Thijssen PMHJ, Overbeeke MAM. Testing efficacy of anti-D sera by a panel of donor red cells with weak reacting D antigen and with partial D antigens. *Vox Sang* 1989;56:274-7.
 9. ศศิธร เพชรจันทร์, จริยา สายพิน, กาญจนา เอื้อตระกูลพูนสุข, ทศน์ยานี จันทนียังยง. Detection of weak D Antigen by Monoclonal and Polyclonal Anti-D. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต* 1994;4:127-34.
 10. Lomas C, Mc Coll K, Tippet P. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. *Transf Med* 1993;3:67-9.
 11. Loma C, Tippet P, Thompson KM, Melamed MD, Hughes-Jones NC. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang* 1989;57:261-4.
 12. Tippet P. Sub-divisions of the Rh (D) antigen. *Med Lab Sci* 1988;45:88-93
 13. Chester MA, Johnson U, Lundblad A, Low B, Messeter L, Samuelson B. *Proceedings of the Second International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies against Human Red Blood cell and Related Antigens* Lund, 1990.
 14. *Technical Manual*. 12th ed. Virginia : Vengelen-Tyler. Am Asso Blood Banks 1996;607.
 15. Sonneborn HH. Monoclonal antibodies for Rh-typing including the determination of D variants. *Clin Lab* 1996;1+2:57-8.
 16. Jones JW, Voak D, Scott ML, Sonneborn HH. Policies for the selection of Rh D typing reagents. *Biotest Bulletin* 1997;5:485-94.
 17. Stroup M. Controversies in Transfusion medicine. D^u testing : Pro Transfusion 1991;3:273-6.
 18. Mayne K, Bowell P, Woodward T, Sibley C, Lomas C, Tippet P. Rh immunization by the partial D antigen of category Dva. *Br J Haematol* 1990;76:537-9.
 19. World Health Organization CBS. *Publishers & Distribution. The Rh blood Group System in Safe Blood and Blood Product, Module 3, Blood group Serology*. 1995: 38.

Evaluation of anti-D Reagents as Rh (D) Blood Typing

Tasaneer Sakuldamrongpanich, Jintana Tubrod, Sarika Saengkla and Udom Tingtoy

Department of Antiserum Preparation, The National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok.

Abstract : A total of eleven anti-D reagents, ten from commercial and one from the National Blood Centre, Thai Red Cross Society (NBC, TRCS) were evaluated for their efficacy as Rh(D) blood typing reagents. They were tested for potency, avidity, specificity and ability to detect weak D antigens, as well as DVI cells. It was found that all anti-D sera were exceeded the potency and avidity requirements of WHO standard by having a titer of greater than 1:64 with R1r cells and giving positive result within sixty second of mixing in manual slide test. Most of them were capable of detecting 20 samples of weak D antigen. For the seven samples of DVI cells, two commercial anti-D sera were unable to detect any of them where as another two commercial anti-D sera detect these cells by direct agglutination. The other six commercial and the NBC TRCS anti-D sera were able to detect DVI cells by indirect antiglobulin test (IAT). In conclusion, the anti-D reagents from various companies differed in efficacy for detection of weak D and D VI cells. Furthermore some of these cells could be typed as Rh(D) positive by one reagent and as Rh(D) negative by another reagent. Evaluation of anti-D reagent is essential in selecting appropriate reagent that can be used for both donor and patient Rh(D) typing.

Key Words : ● Anti-D ● Rh (D) typing

Thai J Hematol Transf Med 1999;9:39-48.