

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาการทดสอบหมู่เลือดระบบอาร์เอชชนิด Rh DEL ด้วยเทคนิค Adsorption และ Elution

รัตนพร โพธิ์¹ จินตนา พัวไพโรจน์² อรุณรัฐ ร่มพฤษ^{3,4} ชาญวิทย์ ลีลาวัฒน์^{3,4} และ อมรรัตน์ ร่มพฤษ^{2,3}

¹สาขาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย ²คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ ³ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์

⁴กลุ่มวิชานิติเวชศาสตร์และวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ หมู่เลือดระบบอาร์เอช (Rh) เป็นหมู่เลือดที่มีความสำคัญทางคลินิกรองจากหมู่เลือดระบบ ABO ในการให้เลือดผู้ป่วย จำเป็นต้องตรวจแอนติเจน D ทั้งผู้ป่วยและเลือดบริจาค เม็ดเลือดแดงที่เป็นอาร์เอชเดล (Rh DEL) จะมีการแสดงออกของแอนติเจน D บนผิวเซลล์น้อยมาก ไม่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect antiglobulin test ทำให้มีลักษณะทางฟิโนทัยป์เป็นอาร์เอชดีลบ แต่สามารถตรวจแอนติเจนนี้ด้วยเทคนิค adsorption-elution การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการทดสอบหาอาร์เอชเดลด้วยเทคนิค adsorption-elution เพื่อให้ได้เทคนิคที่ง่าย เหมาะสม และนำเทคนิคที่พัฒนาได้มาตรวจหาอาร์เอชเดลในผู้บริจาคโลหิตที่เป็นอาร์เอชดีลบ ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถพัฒนาเทคนิค adsorption-elution โดยการใช้ยา Human monoclonal anti-D ชนิด IgG หรือชนิด IgM/IgG ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่การเจือจาง 1:4 ในน้ำยา low ionic strength solution (LISS) และทำ elution ด้วยวิธี Glycine-HCl/EDTA และทดสอบ eluate ด้วยเทคนิคเจล เมื่อนำเทคนิคที่พัฒนาไปศึกษาในผู้บริจาคโลหิตอาร์เอชดีลบจำนวน 79 ราย พบว่ามี 22 ราย ให้ผลบวกในการทดสอบด้วยวิธี adsorption-elution คิดเป็นร้อยละ 27.85 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของผู้บริจาคโลหิตในกลุ่มอื่นๆ ที่มีรายงานมาแล้วให้ผลใกล้เคียงกัน โดยสรุปวิธีการทดสอบอาร์เอชเดล ด้วยเทคนิค adsorption-elution ที่พัฒนาได้ เป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายและรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์การบริการโลหิตได้เป็นอย่างดี

Keywords : ● Rh DEL ● Adsorption ● Glycine-HCl/EDTA elution

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2558;25:35-42.

บทนำ

หมู่เลือดระบบอาร์เอช เป็นหมู่เลือดที่มีความสำคัญทางคลินิก รองจากหมู่เลือดระบบ ABO เนื่องจากแอนติเจนในหมู่เลือดนี้ สามารถกระตุ้นร่างกายให้สร้างแอนติบอดี ที่ทำให้เกิดภาวะ hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) หรือ hemolytic transfusion reaction ได้ ยีนของหมู่เลือดระบบอาร์เอชอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 ประกอบด้วยยีน RHD ที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน D และยีน RHCE ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน C, c, E และ e แต่ละยีนมี 10 exons ปัจจุบัน มีการค้นพบแอนติเจนของหมู่เลือดระบบนี้ถึง 56 แอนติเจน¹ แต่แอนติเจน D ยังคงเป็นแอนติเจนที่สำคัญที่สุด รวมทั้งเป็นตัว

กำหนดฟิโนทัยป์ของหมู่เลือดระบบนี้ว่าเป็นอาร์เอชดีบวกหรืออาร์เอชดีลบ โดยพิจารณาจากการตรวจพบแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงแสดงว่าเป็น อาร์เอชดีบวก ซึ่งคนไทยพบได้ร้อยละ 99.7 แต่ถ้าตรวจไม่พบแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงแสดงว่าเป็นอาร์เอชดีลบ ซึ่งคนไทยพบได้ร้อยละ 0.3²

การทดสอบด้วยวิธีซีโรไลย์ในห้องปฏิบัติการประจำ สามารถตรวจหาแอนติเจน D ได้โดยนำเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-D ถ้าเกิดการจับกลุ่มให้เห็นด้วยตาเปล่า แสดงว่ามีแอนติเจน D สรุปว่าเป็น อาร์เอชดีบวก (D positive) ถ้าไม่พบการจับกลุ่มต้องทดสอบต่อด้วยเทคนิคแอนติโกลบูลิน (indirect antihuman globulin test, IAT) ถ้าให้ผลลบแสดงว่าไม่มีแอนติเจน D สรุปว่าเป็นอาร์เอชดีลบ ถ้าให้ผลบวกกับ IAT เรียกว่า weak D แต่อย่างไรก็ตามพบว่า อาร์เอชดีลบบางรายที่ไม่เกิดปฏิกิริยาในขั้นตอน IAT แต่เมื่อนำไปทดสอบเพิ่มเติมด้วยเทคนิค adsorption-elution³⁻⁶ สามารถตรวจพบแอนติเจน D บนเซลล์เม็ดเลือดแดง

ได้รับต้นฉบับ 1 กรกฎาคม 2557 รับลงตีพิมพ์ 30 กันยายน 2557

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ รศ.อมรรัตน์ ร่มพฤษ คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

E-mail: aromphruk@gmail.com

จึงเรียกลักษณะฟีโนไทป์ชนิดนี้ว่า อาร์เอชเดล (Rh DEL, D-elite)

อาร์เอชเดล (Rh DEL, D-elite) มีการรายงานครั้งแรกเมื่อ ค.ศ.1980 โดย Okubo และคณะ³ ได้พบผู้ป่วยที่มีอาร์เอชดีลบ ได้รับเลือดอาร์เอชดีลบแล้ว เกิดสร้าง anti-D ขึ้นมา⁷⁻⁹ เมื่อทดสอบด้วยวิธี adsorption-elution พบว่าเลือดอาร์เอชดีลบ ที่ให้ผู้ป่วยนั้นมีแอนติเจน D แต่พบแอนติเจนบนผิวเซลล์น้อยมาก จัดอยู่ในกลุ่มของ D variants ซึ่งมีการแสดงออกของแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงประมาณ 20-40 ตำแหน่งต่อเซลล์ ในขณะที่ อาร์เอชดีบวกพบแอนติเจนได้ประมาณ 30,000 ตำแหน่งต่อเซลล์⁴ ในระยะแรก มีการใช้ชื่อว่า Rh Del หรือ Rh D_{el} หรือ Rh D^{el} ปัจจุบันกำหนดให้ใช้ “Rh DEL” Rh DEL แตกต่างจาก weak D คือ Rh DEL มีการเปลี่ยนแปลงของยีน ทำให้การแสดงออกของ แอนติเจนน้อยกว่าแอนติเจน weak D ปัจจุบัน Rh DEL มีลักษณะ ทางชีวโมเลกุลแตกต่างกันออกไป ทำให้พบ Rh DEL ได้ถึง 17 อัลลีล¹⁰ โดย Rh DEL “K409K” เป็นลักษณะอัลลีลที่พบมาก ที่สุดในชาวเอเชีย^{5,11} เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง 1227 ของ exon 9 เปลี่ยนจาก Guanine (G) เป็น Adenine (A) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ตัวสุดท้ายของ exon 9 นิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนของกรดอะมิโน แต่มีผลต่อ RNA splicing ทำให้สร้างโปรตีนออกมาปริมาณน้อย ในชาวยุโรปพบ Rh DEL ประมาณร้อยละ 0.027 ของอาร์เอชดีลบทั้งหมด ในขณะที่ชาวเอเชียพบประมาณร้อยละ 10-30 ของ อาร์เอชดีลบ⁵

ปัจจุบันการทดสอบหา Rh DEL ในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย สามารถทำได้ในบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจาก เทคนิค adsorption-elution ไม่ได้นำมาใช้อย่างแพร่หลาย ประกอบกับยังไม่ตระหนักถึงความสำคัญของการตรวจหา Rh DEL การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค adsorption โดยหา สภาวะที่เหมาะสมให้เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับ anti-D ที่ใช้โดยทั่วไปในประเทศไทย คือ anti-D ที่ผลิตจากศูนย์บริการโลหิตแห่ง ชาติ สภาภชาชาติไทย เพื่อให้ anti-D ถูกดูดซับที่ผิวเม็ดเลือดแดง จากนั้นใช้เทคนิค elution ทำให้ anti-D ซึ่งจับกับแอนติเจน D บนเซลล์แล้ว หลุดออกมาจากเซลล์ และตรวจหา anti-D จาก น้ำ eluate ถ้าพบ anti-D ในน้ำ eluate แสดงว่าเป็น Rh DEL

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างทดสอบ

1.1 ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่เลือดอาร์เอชดีลบ จากการทดสอบทางซีโรโลยีด้วยวิธี indirect antiglobulin test (IAT) ของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ขอนแก่น จำนวน 79 ราย โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจาก คณะกรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 561325) เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 6 มิลลิลิตรในสารกันเลือดแข็ง EDTA

1.2 ตัวอย่างควบคุม เป็นตัวอย่างเลือดอาร์เอชดีบวก อาร์เอชดีลบ และอาร์เอชเดล ที่ทดสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล อย่างละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. แอนติซีรัม เซลล์ และน้ำยาที่ใช้ทดสอบ

2.1 แอนติซีรัม : Human monoclonal (IgM/IgG) anti-D (lot. 54023) และ human monoclonal (IgG) anti-D (lot. 54010) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภาภชาชาติไทย

2.2 เซลล์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ : O cells อาร์เอชดีบวก และ O cells อาร์เอชดีลบ เข้มข้น 1% ใน น้ำยา low ionic strength solution (LISS)

2.3 น้ำยา 0.1 M Glycine-HCl buffer (pH 1.5), 10% EDTA และ 1 M Tris-NaCl

2.4 DG Gel[®] Coombs gel (Grifols, Spain)

วิธีการศึกษา

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับ (adsorption) เพื่อให้ anti-D จับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์

1.1 หาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของน้ำยา anti-D

เจือจางน้ำยา anti-D ชนิด IgG ด้วยน้ำเกลือปกติใน สัดส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 และ 1:2048 นำมาดูดซับกับตัวอย่างเลือด 3 ชนิด ได้แก่เม็ดเลือดแดงที่มีหมู่เลือดอาร์เอชดีบวก อาร์เอชดีลบ และ อาร์เอชเดล จากนั้นทำ elution ด้วยเทคนิค Glycine-HCl/ EDTA¹² และทดสอบ eluate ที่ได้ด้วย DG Gel[®] Coombs gel ขั้นตอนการดูดซับแอนติบอดี (adsorption)¹³

1. ปั่นล้างเม็ดเลือดแดงประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วย น้ำเกลือปกติจำนวน 3 ครั้ง ด้วยแรงเหวี่ยง 1,000 x g นาน 5 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้งได้เม็ดเลือดแดงอัดแน่น

2. นำน้ำยา anti-D ที่ถูกเจือจางแล้ว 400 ไมโครลิตร ผสมกับเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ระหว่าง นั้นให้เขย่าเบาๆ เป็นระยะ เพื่อให้แอนติบอดีถูกดูดซับบนเม็ด เลือดแดงได้ดีขึ้น

4. เมื่อครบเวลานำไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 1,000 x g นาน 5 นาที ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ล้างเม็ดเลือดแดงที่ถูกดูดซับแล้ว (adsorbed cells) ด้วยน้ำเกลือจำนวน 6 ครั้ง เก็บน้ำล้างครั้งที่ 6 ไว้เป็น negative control (eluate control)

1.2 เปรียบเทียบการเจือจางน้ำยา anti-D ด้วยน้ำเกลือปกติ (normal saline) และน้ำยา LISS และระยะเวลาการดูดซับ (incubation time)

เจือจางน้ำยา anti-D ชนิด IgG ด้วยน้ำเกลือปกติ และน้ำยา LISS ในสัดส่วน 1:4 ทำการดูดซับกับตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ เม็ดเลือดแดงที่มีหมู่เลือดอาร์เอสดีบวก อาร์เอสดีลบ และอาร์เอสเซลล์ โดยอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ในน้ำเกลือปกติ และ 15 นาที ในน้ำยา LISS ทำ elution ด้วยเทคนิค Glycine-HCl/EDTA และทดสอบ eluate test ด้วย DG Gel®Coombs gel

1.3 เปรียบเทียบชนิดของน้ำยา anti-D ระหว่าง human monoclonal IgG กับ IgM/IgG

เจือจางน้ำยา anti-D ชนิด IgG หรือ IgM/IgG ด้วยน้ำยา LISS ในสัดส่วน 1:4 ทำการดูดซับแอนติบอดีกับตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ เม็ดเลือดแดงที่มีหมู่เลือดอาร์เอสดีบวก อาร์เอสดีลบ และอาร์เอสเซลล์ นำไปอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ทำการทดสอบ elution ด้วยเทคนิค Glycine-HCl/EDTA และทดสอบ eluate ด้วย DG Gel®Coombs gel

2. เปรียบเทียบเทคนิค elution ระหว่าง Glycine-HCl/EDTA กับ Lui freeze thaw

ทำการดูดซับแอนติบอดีกับตัวอย่างเลือด 2 ชนิด ได้แก่ เม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีลบ และอาร์เอสเซลล์ โดยเจือจางน้ำยา anti-D ชนิด IgG ด้วยน้ำยา LISS ในสัดส่วน 1:4 นำไปอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที แบ่ง adsorbed cells ที่ล้างแล้วเป็นสองส่วน นำไปทำ elution ด้วยเทคนิค Glycine-HCl/EDTA และ Lui freeze thaw⁽¹⁴⁾ ทดสอบ eluate ที่ได้จากทั้งสองวิธี ด้วย DG Gel®Coombs gel

ขั้นตอนการทำ elution ด้วยวิธี Glycine-HCl/EDTA⁽¹²⁾

1. นำ adsorbed cell ที่ล้างแล้วปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมกับ eluting solution 180 ไมโครลิตร (eluting solution เตรียมได้จาก 0.1 M glycine-HCl ปริมาตร 136 ไมโครลิตร และ 10% EDTA ปริมาตร 44 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที

2. เติม 1 M Tris-NaCl ปริมาตร 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 1000 x g นาน 2 นาที เก็บน้ำส่วนใส (eluate) เพื่อนำไปทดสอบต่อ กับ O cells เข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS

ขั้นตอนการทำ elution ด้วยวิธี Lui freeze thaw⁽¹⁴⁾

1. เติม adsorbed cell ที่ล้างแล้วปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเกลือ 180 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 12 x 75

มม. ปิดปากหลอดให้แน่นด้วยพาราฟิล์ม ผสมให้เข้ากัน (โดยการหมุนหลอดทดลองตามแนวนอน)

2. นำไปแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -80°C นาน 10 นาที โดยวางหลอดทดลองในแนวนอน แล้วนำไปละลายในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°C ประมาณ 1 นาที ทำการปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 1000 x g นาน 2 นาที เก็บน้ำส่วนใส (eluate) เพื่อนำไปทดสอบต่อ กับ O cells เข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS

ขั้นตอนการทดสอบ eluate ด้วย DG Gel®Coombs gel

1. นำน้ำส่วนใส (eluate) ที่ได้มาทดสอบหา anti-D ด้วยวิธี DG Gel®Coombs gel โดยใช้ eluate และ eluate control ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ 1% O cells ในน้ำยา LISS ที่มีหมู่เลือดอาร์เอสดีบวกและลบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที ปั่นอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องปั่นอ่านผล

2. การอ่านผลปฏิกิริยาจากจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ถ้าปฏิกิริยาให้ผลบวกจะมีกลุ่มของเม็ดเลือดแดงค้างอยู่ด้านบนของ gel โดยอ่านปฏิกิริยา 4+, 3+, 2+, 1+ ตามความแรงของปฏิกิริยา แต่ถ้าปฏิกิริยาให้ผลลบจะไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงจะตกรวมกันอยู่บริเวณก้นหลุม

3. การทดสอบหาอาร์เอสเซลล์ในตัวอย่างเลือดอาร์เอสดีลบ

นำเทคนิค adsorption-elution ที่พัฒนาได้ทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดอาร์เอสดีลบจำนวน 79 ราย โดยมีตัวอย่างควบคุมหมู่เลือดอาร์เอสดีบวก (positive control) และ ตัวอย่างเลือดอาร์เอสดีลบ (negative control) ควบคุมด้วยทุกครั้ง

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ความถี่ของอาร์เอสเซลล์ในท้ายปีคำนวณจาก จำนวนตัวอย่างเลือดอาร์เอสดีลบที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ adsorption-elution ดังนี้

% ความถี่ของปีในท้ายปี = (จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ ÷ จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ) x 100

และเปรียบเทียบความถี่ของอาร์เอสเซลล์ในท้ายปีกับประชากรกลุ่มต่างๆ ด้วย Chi-square test และค่า p-value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับ anti-D บนผิวเซลล์

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการเจือจางน้ำยา anti-D ชนิด IgG ในลักษณะ two-fold dilution ทำการดูดซับกับเม็ดเลือดแดงทั้ง 3 ชนิด ได้ผลตาม Table 1 เมื่อดูดซับเม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีบวก ด้วย anti-D แบบไม่เจือจาง (1:1) และเจือจางในสัดส่วน

Table 1 Optimization of anti-D for red cell adsorption

Cell Type	EL/ EC tested	Diluted anti-D												
		with	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Rh D positive	EL	D+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EC	D+	2+	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rh D negative	EL	D+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EC	D+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rh DEL	EL	D+	2+	2+	2+	2+	1+	0	0	0	0	0	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	EC	D+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		D-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

EL = eluate; EC = eluate control

1:2 ให้ผลบวกกับ eluate control ที่ความแรง 2+ และ 1+ ตามลำดับ ในขณะที่เจือจางในสัดส่วน 1:4 eluate control ให้ผลลบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งสามชนิด ดังนั้นจึงเลือกการเจือจางที่ 1:4 สำหรับการดูดซับแอนติบอดี ซึ่งเม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีบวกให้ปฏิกิริยาจับกลุ่ม 4+ และเม็ดเลือดแดงอาร์เอสเดลให้ปฏิกิริยาจับกลุ่ม 2+

จากการเปรียบเทียบระยะเวลาในการดูดซับเพื่อให้ anti-D จับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ ด้วยน้ำยา anti-D ที่การเจือจาง 1:4 ด้วยน้ำเกลือปกติ ระหว่างเวลานาน 30 นาที และ 60 นาที และเจือจางด้วยน้ำยา LISS ที่เวลานาน 15 นาที พบว่าระยะเวลาในการดูดซับแอนติบอดีของเม็ดเลือดแดง ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน โดยเม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีบวกให้ปฏิกิริยาจับกลุ่มความแรง 4+ เม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีลบให้ปฏิกิริยาจับกลุ่ม และเม็ดเลือดแดงอาร์เอสเดลให้ปฏิกิริยาความแรง 3+ ดังแสดงใน Table 2

จากการเปรียบเทียบชนิดของน้ำยา anti-D ระหว่าง human monoclonal IgG กับ human monoclonal IgM/IgG พบว่าให้ผลการทดสอบเหมือนกัน คือเม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีบวกให้ปฏิกิริยาจับกลุ่มความแรง 4+ กับแอนติบอดีทั้งสองชนิด เม็ดเลือดแดงอาร์เอสดีลบให้ปฏิกิริยาจับกลุ่ม และเม็ดเลือดแดงอาร์เอสเดลให้ปฏิกิริยาความแรง 3+ ดังแสดงใน Table 2

การเปรียบเทียบเทคนิค elution ระหว่าง Glycine-HCl/EDTA กับ Lui freeze thaw

เมื่อดูดซับ anti-D กับเม็ดเลือดแดงอาร์เอสเดล และทดสอบเปรียบเทียบเทคนิค elution ระหว่าง Glycine-HCl/EDTA กับ

Lui freeze thaw พบว่าให้ผลปฏิกิริยาแตกต่างกัน โดยการทำ elution ด้วยวิธี Glycine-HCl/EDTA ให้ปฏิกิริยาจับกลุ่มความแรง 4+ ชัดเจน ส่วนวิธี Lui freeze thaw ให้ปฏิกิริยาจับกลุ่มความแรง 3+ ขณะเดียวกันวิธี Glycine-HCl/EDTA จะอ่านผลปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าวิธี Lui freeze thaw เนื่องจาก eluate ที่ได้มีสีใส ไม่รบกวนการอ่านผล (Figure 1)

การทดสอบอาร์เอสเดลในตัวอย่างเลือดอาร์เอสดีลบ

จากการทดสอบตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีในงานประจำ จำนวน 79 ราย พบว่า 22 รายให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยเทคนิค adsorption และ Glycine-HCl/EDTA elution คิดเป็นร้อยละ 27.83 (Table 3) โดยให้ปฏิกิริยาจับกลุ่มความแรงตั้งแต่ 2+ ถึง 4+

วิจารณ์

ในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์การบริการโลหิต เทคนิค adsorption-elution ถูกนำมาช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ในงานประจำเช่น การตรวจยืนยันหมู่เลือด subgroup A หรือ subgroup B ซึ่งมีแอนติเจน A หรือ B ที่ผิวเซลล์น้อยกว่าปกติ หรือใช้ช่วยในการแยกแอนติบอดีหลายชนิดออกจากกัน¹⁵ การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค adsorption ซึ่งเป็นขบวนการที่ทำให้แอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ มาใช้ตรวจยืนยันชนิดของแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงในหมู่เลือดอาร์เอสเดลที่มีแอนติเจน D ปริมาณน้อยมาก จากนั้นจึงตรวจหา anti-D ในน้ำ eluate เพื่อยืนยันการพบแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดง เทคนิค adsorption-elution

Table 2 Various conditions for Rh positive, Rh negative and Rh DEL adsorption

Cell Type	Anti-D	Diluted anti-D with	Incubation time (min)	Eluate tested with		Eluate control tested with	
				D+	D-	D+	D-
Rh D positive	IgG	NSS	60	4+	0	0	0
		NSS	30	4+	0	0	0
		LISS	15	4+	0	0	0
	IgM/IgG	NSS	60	4+	0	0	0
		NSS	30	4+	0	0	0
		LISS	15	4+	0	0	0
Rh D negative	IgG	NSS	60	0	0	0	0
		NSS	30	0	0	0	0
		LISS	15	0	0	0	0
	IgM/IgG	NSS	60	0	0	0	0
		NSS	30	0	0	0	0
		LISS	15	0	0	0	0
Rh DEL	IgG	NSS	60	3+	0	0	0
		NSS	30	3+	0	0	0
		LISS	15	3+	0	0	0
	IgM/IgG	NSS	60	3+	0	0	0
		NSS	30	3+	0	0	0
		LISS	15	3+	0	0	0

NSS = normal saline; LISS = low ionic strength solution

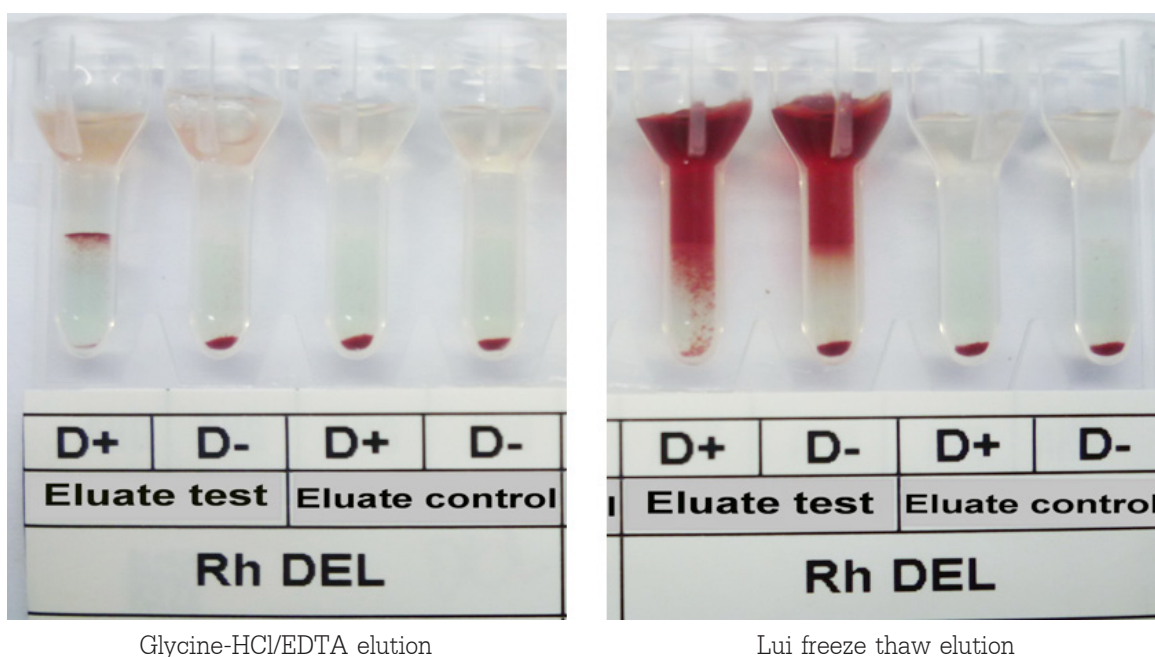


Figure 1 Detection of anti-D in eluate from Glycine-HCl/EDTA and Lui freeze thaw elution. Red cells from Rh DEL was adsorbed with diluted anti-D and eluted by Glycine-HCl/EDTA and Lui freeze thaw elution. Eluate and eluate control were tested for anti-D by Gel test.

Table 3 Rh DEL frequencies in Rh negative blood donors in different populations

Study reports	Rh negative (n)	Rh DEL (n)	Rh DEL frequencies (%)	p-value
This study	79	22	27.83	
Thais ²¹	254	50	19.70	0.123
Taiwanese ²²	294	94	31.97	0.482
Chinese in Hong Kong ²³	465	136	29.24	0.800
Chinese in Shanghai ²⁵	1585	279	17.60	0.021*
Japanese ²⁴	306	102	33.33	0.352

* = significant difference when compared to this study (p-value < 0.05)

มีข้อควรระวังคือ หลังจากดูดซับแอนติบอดีบนผิวเซลล์แล้ว ต้องล้างแอนติบอดีที่ไม่เกาะบนผิวเซลล์ (free antibody) ออกให้หมด ถ้ายังมีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่ จะทำให้ eluate เกิดผลบวกปลอม โดยมาตรฐานแล้วก่อนนำเซลล์ไปทำ elution ต้องล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 6 ครั้ง และเก็บน้ำล้างเซลล์ครั้งที่ 6 ไว้เป็น eluate control ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับแอนติเจนเป้าหมาย จะต้องให้ผลลบเสมอ¹⁶ จากผลการศึกษาจะเห็นว่าความเข้มข้นของน้ำยา anti-D ที่ใช้ต้องเหมาะสม ถ้าใช้น้ำยา anti-D ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป หลังจากแอนติบอดีถูกดูดซับบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้ว ในขั้นตอนการล้างเซลล์แอนติบอดีสามารถหลุดออกจากผิวเซลล์ได้ ทำให้การทดสอบ eluate control ได้ผลบวก ดัง Table 1 การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้น้ำยา anti-D ที่การเจือจาง 1:4 ดังนั้นน้ำยา anti-D แต่ละชุดการผลิตที่ใช้สำหรับดูดซับบนเซลล์ ต้องหาการเจือจางที่เหมาะสมในการใช้งานเสมอ

เทคนิค adsorption เป็นการดูดซับแอนติบอดีบนผิวเซลล์ โดยทั่วไปจะใช้เวลาการดูดซับ ประมาณ 30-60 นาที การดูดซับแอนติบอดีเป็นการเกิดปฏิกิริยา antigen - antibody complex ซึ่งในขั้นตอนแรก (sensitization phase) สามารถเกิดได้ดีในตัวอย่าง LISS และใช้ระยะเวลาเพียง 15 นาที¹⁷⁻²⁰ ดังนั้นเพื่อเป็นการประหยัดเวลาในการทดสอบ การศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบระหว่างการเจือจาง anti-D ด้วยน้ำเกลือปกติ และน้ำยา LISS พบว่า eluate ที่ได้ มีความแรงของปฏิกิริยาไม่แตกต่างกัน ตาม Table 2 จึงเลือกใช้ตัวกลาง LISS ในการดูดซับแอนติบอดี ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติได้ผลิตและจำหน่ายน้ำยา anti-D ชนิด human monoclonal IgM/IgG เพื่อใช้ในงานตรวจประจำของห้องปฏิบัติการทั่วประเทศ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้เปรียบเทียบน้ำยา anti-D ทั้งชนิด IgG และชนิด IgM/IgG ในการดูดซับบนผิวเซลล์ และพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้น้ำยา anti-D ชนิด IgM/IgG เจือจางน้ำด้วย LISS และใช้ระยะเวลาในการดูดซับแอนติบอดีนาน 15 นาที เพื่อความสะดวกและลดระยะเวลาในการทดสอบ

เทคนิค elution เป็นการทำให้แอนติบอดีซึ่งจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ หลุดออกมาจากผิวเซลล์ เทคนิค elution มีหลายวิธี เช่น วิธี Glycine-HCl/EDTA ที่อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลง pH และวิธี Lui freeze thaw อาศัยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ทำให้แอนติบอดีหลุดออกจากผิวเซลล์ ผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีแยก anti-D ที่ถูกดูดซับบนผิวเซลล์ให้หลุดออกมาอยู่ใน eluate โดยใช้วิธี Glycine-HCl/EDTA และวิธี Lui freeze thaw elution พบว่าวิธี Lui freeze thaw เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้น้ำยาสารเคมี แต่ eluate ที่ได้มีสีแดงเข้ม ทำให้รบกวนการอ่านปฏิกิริยาในกรณีที่ตรวจสอบ eluate ด้วยวิธีเจล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เทคนิค Glycine-HCl/EDTA elution ซึ่งให้ผลที่ชัดเจนและใช้เวลาน้อยกว่าในการทำ elution

เมื่อนำเทคนิคที่ได้ทำการตรวจหาอาร์เอสเดลในผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่เลือดอาร์เอสดีลบ ของคลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลจากการศึกษาในผู้บริจาคโลหิตทั้งหมด 79 ราย พบว่าผู้บริจาคโลหิตจำนวน 22 ราย ให้ผลบวกในการทดสอบด้วยวิธี adsorption-elution คิดเป็นร้อยละ 27.85 ซึ่งพบได้มากกว่าการศึกษาของผู้บริจาคโลหิตชาวไทยที่มีรายงานมาแล้ว (19.70%)²¹ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษาในประชากรอื่นๆ เช่น จีนไต้หวัน จีนฮ่องกง และญี่ปุ่นพบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน²²⁻²⁴ แต่พบแตกต่างจากจีนซึ่งยังใช้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ²⁵ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของแอนติเจนอาร์เอสเดลในคนไทย เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะของอัลลีลที่พบได้ในกลุ่มดังกล่าว และนำมาประเมินถึงความจำเป็นของการใช้เทคนิคชีวโมเลกุลในการแยกชนิดแอนติเจนอาร์เอสเดล ซึ่งผู้วิจัยกำลังดำเนินการศึกษา

โดยสรุปวิธีการทดสอบหาหมู่เลือดอาร์เอสเดล (Rh DEL) ด้วยเทคนิค adsorption-elution ที่พัฒนาขึ้น เป็นเทคนิคที่สะดวกง่ายและรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์การบริการโลหิตได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ หลักสูตรชีวเวชศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Publishing 2005:163-208.
- Fongsaran J, Nuchprayoon I, Yodin S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood Groups in Thai Blood Donors. *Thai J Hematol Transfus Med* 2002;12:277-86.
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, Nagao N. A D variant, Del. *Transfusion* 1984;24:542.
- Kormoczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005;45:1561-7.
- Shao CP, Maas JH, Su YQ, Kohler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D- negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156-61.
- Li Q, Ye LY, Guo ZH, Qian M, Zhu ZY. Study on the molecular background of Del phenotype in Chinese population. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi* 2006;23:486-91.
- Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520-6.
- Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion* 2005;45:1581-4.
- Shao CP, Wang BY, Ye SH, Zhang WL, Xu H, Zhuang NB, et al. DEL RBC transfusion should be avoided in particular blood recipient in East Asia due to allosensitization and ineffectiveness. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13:913-8.
- Shao CP, Xu H, Xu Q, Sun GD, Li JP, Zhang BW, et al. Antenatal Rh prophylaxis is unnecessary for "Asia type" DEL women. *Transfus Clin Biol* 2010;17:260-4.
- Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D-Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion* 2005;45:345-52.
- Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. Method 4-2 Glycine-HCl/EDTA elution procedure. In: *Technical Manual*. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank 2011:918-19.
- Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. Method 3-12 adsorption procedure. In: *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks 2011:914.
- Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. Method 4-4 Lui freeze-thaw elution procedure. In: *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks 2011:919-20.
- Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD, eds. Adsorption, elution and combined adsorption-elution. In: *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks 2011:478-80.
- Howard PL. Principles of antibody elution. *Transfusion* 1981;21:477-83.
- Voak D, Downie DM, Darnborough J, Haigh T, Fairham SA. Low-ionic strength media for rapid antibody detection: optimum conditions and quality control. *Med Lab Sci* 1980;37:107-18.
- Low B, Messeter L. Antiglobulin test in low-ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. *Vox Sang* 1974;26:53-61.
- Wicker B, Wallas CH. A comparison of a low ionic strength saline medium with routine methods for antibody detection. *Transfusion* 1976;16:469-72.
- Duguid JK. Developing techniques in blood transfusion. *Baillieres Clin Haematol* 1990;3:999-1017.
- Srijinda S, Suwanasophon C, Visawapoka U, Pongsavee M. RhC phenotyping, adsorption/elution test, and SSP-PCR: The combined test for D-elite phenotype screening in Thai RhD-negative blood donors. *ISRN Hematol* 2012;2012:358316.
- Yang YF, Wang YH, Chen JC, Eng HL, Lin TM. Prevalence of RHD 1227A and hybrid Rhesus box in the general Chinese population. *Transl Res* 2007;149:31-6.
- Mak KH, Yan KF, Cheng SS, Yuen MY. Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. *Transfusion* 1993;33:348-51.
- Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, Nagao N, Shibata H, Okubo Y, et al. Further analysis of Del (D- elite) using polymerase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. *Transfus Med* 1997;7:227-31.
- Li Q, Hou L, Guo ZH, Ye LY, Yue DQ, Zhu ZY. Molecular basis of the RHD gene in blood donors with DEL phenotypes in Shanghai. *Vox Sang* 2009;97:139-46.

Rh DEL Phenotype Detection by Adsorption and Elution Techniques

Rattanaorn Phothi¹, Chintana Paupairoj², Arunrat Romphruk^{3,4}, Chanvit Leelayuwat^{3,4}
and Amornrat Romphruk^{2,3}

¹Biomedical Sciences Program, Faculty of Graduate School; ²Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine; ³Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences; ⁴Department of Clinical Immunology and Transfusion Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

Abstract: Rh blood group system is the second most important blood group after the ABO system in clinical blood transfusion. The determination of RhD antigen in both the patients and donors is essential for transfusion medicine. According to the previous serological studies, red blood cells of Rh DEL individuals have a very low expression of D antigens, and they are often misinterpreted as RhD negative because of the limitations of current routine test using indirect antiglobulin test. By definition, Rh DEL can be detected by adsorption-elution technique. This study aimed to develop an adsorption-elution technique for detection of Rh DEL phenotype. RhD negative blood samples were adsorbed with monoclonal anti-D IgG or IgM/IgG from the National Blood Centre, Thai Red Cross Society, in a dilution of 1:4 with low ionic strength solution (LISS). Glycine-HCl/EDTA elution was used and eluate was tested by gel test. We found that 27.85% (22/79) of Rh negative donors were positive by our method, similar to those previously reported. Detection of Rh DEL by an adsorption-elution technique in this study is simple, rapid and can be used in routine laboratory.

Keywords : ● Rh DEL ● Adsorption ● Glycine-HCl/EDTA elution

J Hematol Transfus Med 2015;25:35-42.