

นิพนธ์ต้นฉบับ

อุบัติการณ์ของ Partial D Categories ในผู้บริจาคโลหิตไทย

สาริกา เมฆฉาย อัจฉรา ศิริพงษ์ฐานสิทธิ์ และ ทศนีย์ สกุดดำรงคพานิช

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ : วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ partial D categories ต่างๆ ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่ตรวจพบว่าเป็น weak-D ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย **วัสดุและวิธีการ :** ทดสอบตัวอย่างโลหิตบริจาคที่เป็น weak D (D^u) จำนวน 81 ราย โดยให้ทำปฏิกิริยากับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D (IgM + IgG) จำนวน 6 บริษัท และนำมาตรวจแยกชนิด partial D categories ด้วยชุดน้ำยา D-Screen (Diagast Laboratoires, France) แปลผลการทดสอบโดยเทียบกับตาราง panel ของชุดน้ำยา **ผลการศึกษา :** โลหิตบริจาค weak D ทั้ง 81 ราย ให้ผลบวกกับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D (IgM+IgG) ของทุกบริษัท แต่มีความแรงของปฏิกิริยาแตกต่างกัน ทั้งการอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง 37°C และ antiglobulin test ชุดน้ำยา D-Screen สามารถตรวจพบว่าเป็น partial D จำนวน 62 ราย (ร้อยละ 76.54) โดยแยกเป็น category ต่างๆดังนี้ DII 1 ราย (ร้อยละ 1.23) DIII 21 ราย (ร้อยละ 25.93) DVI 30 ราย (ร้อยละ 37.04) DVII 5 ราย (ร้อยละ 6.17) และ DFR 5 ราย (ร้อยละ 6.17) แต่อีก 19 ราย (ร้อยละ 23.46%) ผลการทดสอบไม่ตรงกับ partial D categories ใดๆ จึงแปลผลเป็น weak D **วิจารณ์/สรุป :** ในจำนวนผู้บริจาคที่เป็น weak D 81 ราย ชุดตรวจ D-Screen สามารถใช้ตรวจแยก partial D categories ต่างๆได้ โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่า DVI เป็น D category ที่ตรวจพบมากที่สุดและ DIII ให้ผลบวกกับน้ำยา anti-D ทุกบริษัทจึงไม่สามารถแยกจาก D บวกได้เช่นเดียวกับ weak D ที่ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็น partial D category ชนิดใด จึงควรทำการตรวจในระดับโมเลกุล ต่อไป

Key Words : ● Weak D ● Partial D categories ● D epitopes ● ชุดน้ำยา D-Screen

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2553;20:105-12.

หมู่โลหิต RhD สามารถตรวจได้โดยให้เม็ดเลือดแดง ทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-D ถ้าได้ผลบวกแสดงว่าเป็น Rh บวก ถ้าได้ผลลบแสดงว่าเป็น Rh ลบ ในปี 1946 มีรายงานการพบเม็ดเลือดแดงที่ทำปฏิกิริยากับ anti-D แต่ให้ผลบวกอ่อนกว่า Rh บวกทั่วไปให้ชื่อว่า D^u เข้าใจว่าเกิดจากการมีปริมาณ แอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าหมู่ D ปกติ คือมีความบกพร่องด้านปริมาณ (quantitative defect)¹ เม็ดเลือดแดง D^u บางรายทำปฏิกิริยากับ anti-D แรงกว่า เม็ดเลือดแดง D^u ของคนอื่นๆ จึงเรียกเป็น high grade D^u และ low grade D^u ² ในปี 1953 มีรายงานการตรวจพบ alloanti-D ในซีรัมผู้ป่วย Rh บวกซึ่งเป็นผลจากการได้รับเลือด Rh บวกมาก่อน³ ต่อมาพบว่า D แอนติเจนมีความซับซ้อนเป็น mosaic แอนติเจนประกอบด้วยหลาย epitopes ผู้ป่วยที่ขาดบาง epitopes คือมีความบกพร่องด้านคุณภาพ (qualitative

defect) เมื่อได้รับเลือดที่เป็น Rh บวกปกติสามารถสร้าง anti-D ต่อแอนติเจน D เฉพาะส่วนที่ตนเองขาดได้ ให้ชื่อว่า D variant⁴ นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ D variant บางรายมีปริมาณ แอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงน้อยมากด้วย จึงเรียกชื่อเป็น D^u variant ภายหลังนิยมให้เรียกเม็ดเลือดแดงที่มีปริมาณ แอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงน้อยกว่าปกติ (D^u) ว่า weak D และเรียกเม็ดเลือดแดงที่ขาดบาง epitopes ของแอนติเจน D ว่า partial D⁵

การศึกษา partial D ทำโดยใช้เม็ดเลือดแดงและซีรัมของ partial D ที่สร้าง alloanti-D มาทำปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-testing) ทำให้สามารถแยก partial D ออกเป็น 7 categories คือ D categories I-VII ต่อมา DI ถูกยกเลิกไป และ DIII, DIV, DV ถูกแบ่งย่อยออกไปอีก^{6,7} D categories ต่างๆ ยกเว้น DIII จะมีส่วนของ D epitope ขาดหายไปจาก Rh ปกติ ประมาณ 2 ถึง 5 epitopes ต่อมาเมื่อการผลิตโมโนโคลนัล anti-D ประสบความสำเร็จ จึงได้นำมาทดสอบกับ D categories ต่างๆ และรายงานพบว่า แอนติเจน D ประกอบด้วย 9 epitopes คือ ep1 ถึง ep9^{8,9} ต่อมา Scott ML และคณะ ได้ทำการทดสอบระหว่าง

ได้รับต้นฉบับ 26 กุมภาพันธ์ 2553 ให้ลงตีพิมพ์ 16 มีนาคม 2553

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวสาริกา เมฆฉาย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โมโนโคลนัล anti-D จำนวนมากกับ D categories ต่างๆ และพบว่าเซลล์ partial D มีรูปแบบหลากหลายมากขึ้น สามารถแยก D epitopes ได้มากถึง 30 epitopes¹⁰ นอกจากนี้โมโนโคลนัล anti-D ยังทำให้ตรวจพบ partial D อื่นๆ เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ DFR, DHMi, DBT และ Ro^{Har} 11,12,13 เนื่องจากการผลิตโมโนโคลนัล anti-D ทั้งชนิด IgG และ IgM ส่วนใหญ่ผลิตจากโคลนของเซลล์ที่ต่างกันและเซลล์แต่ละโคลนจะสร้าง anti-D ที่มีความจำเพาะต่อ epitopes ที่แตกต่างกันของ D แอนติเจน จึงมีการศึกษาเพื่อคัดเลือก panel ของโมโนโคลนัล anti-D ที่เหมาะสมเพื่อนำมาผลิตเป็นชุดน้ำยาใช้ตรวจแยกชนิด partial D categories และตรวจ weak D สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการอ้างอิงต่างๆ¹⁴

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ทำการตรวจแอนติเจน D ในผู้บริจาคโลหิตทุกราย โดยในอดีตใช้น้ำยา anti-D polyclonal ที่ผลิตจากซีรัมคน ต่อมาในปี 2539 ได้เริ่มใช้น้ำยา โมโนโคลนัล anti-D (IgM+IgG) เมื่อตรวจพบว่าตัวอย่างโลหิตใดทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-D ให้ผลลบ หรือ ผลบวก weak ที่อุณหภูมิห้องจะทำการทดสอบต่อที่ 37° ซ และที่ antiglobulin test (weak D test) เพื่อตรวจว่าโลหิตนั้นเป็น D ลบ หรือ weak D ถ้าเป็น weak D จะติดซีบิงโลหิตบริจาคถุงนั้นเป็นหมู่ RhD บวกแต่ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็น weak D หรือ partial D นอกจากนี้ได้มีการศึกษาและพบว่าน้ำยา โมโนโคลนัล anti-D ของบริษัทต่างๆ จะให้ผลการตรวจ weak D แตกต่างกัน ทั้งการอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง และ antiglobulin test โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำปฏิกิริยากับ DVI น้ำยา anti-D ของบางบริษัท ตรวจพบเป็นบวกเช่นเดียวกับ D บวกปกติ ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจแอนติเจน D ในผู้ป่วย¹⁵ การศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาข้อบ่งชี้การของ partial D categories ต่างๆ ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่ตรวจว่าเป็น weak D โดยเฉพาะอย่างยิ่ง partial DVI category เพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนทางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจแอนติเจน D ในผู้บริจาคโลหิต และผู้ป่วยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างโลหิต

1.1 ในการศึกษาใช้โลหิตของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2539-2550 ที่ผ่านการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยน้ำยาโพลีโคลนัล หรือ โมโนโคลนัล anti-D (IgM+ IgG) และถูกบันทึกผลในคอมพิวเตอร์เป็น D^u หรือ weak D คือให้ผลบวกเมื่อทำ indirect antiglobulin test (IAT) เท่านั้นหรือให้ผลบวกน้อยกว่า 2+ ในการอ่านผลที่อุณหภูมิ

ห้อง และให้ผลลบในการทดสอบ direct antiglobulin test โดยเก็บตัวอย่างโลหิตในน้ำยา ACD หรือ CPD จำนวน 81 ราย

1.2 เม็ดเลือดแดง Rh (D) บวก และ Rh (D) ลบ เพื่อเป็น positive และ negative control จำนวนอย่างละ 2 ราย

2. น้ำยาโมโนโคลนัล anti-D (IgM+IgG) จำนวน 6 บริษัท ได้แก่

- 2.1 Monoclonal Anti-D (NBC, ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, NBC)
- 2.2 Monoclonal Anti-D (Tulip Diagnostics, India)
- 2.3 Monoclonal Anti-D (Totem, Diagast Laboratoires, France)
- 2.4 Monoclonal Anti-D (Bioclone, Ortho Diagnostic System, USA)
- 2.5 Monoclonal Anti-D (Newmarket Laboratories Ltd, England)
- 2.6 Monoclonal Anti-D (DiaMed, DiaMed AG, Switzerland)

3. ชุดน้ำยาตรวจแยกชนิด partial D categories D-Screen (Diagast Laboratoires, France) ประกอบด้วยโมโนโคลนัล anti-D ชนิด IgM และ IgG ผลิตจาก 9 cell lines แอนติบอดีของแต่ละ cell line มีความจำเพาะต่อ epitopes ที่แตกต่างกันของแอนติเจน D (ตารางที่ 1)

4. Coombs Control Cells, NBC ใช้ยืนยันผลลบในขั้นตอนการทดสอบ indirect antiglobulin test

วิธีการทดสอบ

1. ตรวจหาแอนติเจน D ในตัวอย่างโลหิตที่เป็น weak D โดยนำเม็ดเลือดแดง มาทดสอบกับโมโนโคลนัล anti-D จำนวน 6 บริษัท ตามคำแนะนำในเอกสารกำกับน้ำยาน้ำยาอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง ถ้าได้ผลบวกน้อยกว่า 2+ หรือผลลบ ทำ weak D test ต่อ โดย incubate ที่ 37° ซ นาน 15-30 นาทีและทำ IAT หลอดที่ให้ผลลบหยด Coombs Control Cell 1 หยด และอ่านผลซ้ำ ซึ่งถ้าได้ผลบวกแสดงว่าเป็น Rh ลบจริง
2. การทดสอบแยกชนิด partial D categories โดยนำเม็ดเลือดแดง weak D ทดสอบกับ ชุดน้ำยาตรวจ D-Screen ตามคำแนะนำในเอกสารกำกับน้ำยา น้ำยาที่เป็นโมโนโคลนัล anti-D ชนิด IgM จะอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง น้ำยาชนิดที่เป็นโมโนโคลนัล anti-D IgG จะทำการทดสอบด้วยวิธี IAT อ่านผลและแปลผลการทดสอบโดยเทียบกับตาราง panel ของชุดน้ำยาตรวจ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรูปแบบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง Partial D categories ต่างๆ กับชุดน้ำยา D-screen (Diagast)

No	Source*	Type	Partial D Categories										
			D ^{II}	D ^{IIIa} D ^{IIIb} D ^{IIIc}	D ^{IVa}	D ^{IVb}	D ^{Va}	D ^{VI}	D ^{VII}	DFR	DBT	Ro ^{Har}	HMi
1	HM 10	IgM	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
2	HM 16	IgG	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
3	P3x61	IgM	+	+	+	+	+	-	+	±	+	+	+
4	P3x35	IgG	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
5	P3x212 11 F1	IgM	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
6	P3x212 23 B10	IgM	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
7	P3 x 241	IgG	+	+	+	+	-	-	+	±	-	-	+
8	P3 x 249	IgG	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
9	P3 x 290	IgG	+	+	±	-	+	±(1)	+	+	-	-	+

- “+” means positive results (1+ - 3+)
- “±” means positive or negative results
- (1) positive or negative reaction:probably due to the DVI categories a,b or c
- “-” means negative results

* cell lines used in the production of monoclonal antibodies

ตารางที่ 2 แสดง efficacy ของน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D จำนวน 6 ชนิด ในการตรวจพบ weak D จำนวน 81 ราย โดยการอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง (RT) และการทำ Indirect Antiglobulin Test (IAT)

	Monoclonal anti-D (IgM + IgG)	Efficacy (n=81)	
		No of detected at RT (%)	No of detected at IAT (%)
1	NBC	24 (29.63%)	81 (100%)
2	Tulip	34 (41.98%)	81 (100%)
3	Totem	53 (65.43%)	81 (100%)
4	Bioclone	28 (34.57%)	81 (100%)
5	Newmarket	34 (41.98%)	81 (100%)
6	Diamed	32 (39.51%)	81 (100%)

ผลการศึกษา

จากข้อมูลพื้นฐานที่เก็บในคอมพิวเตอร์ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในปี 2550 มีผู้บริจาคโลหิตทั้งสิ้นจำนวน 1,586,828 ราย มีหมู่โลหิต Rh บวก 1,581,202 ราย (ร้อยละ 99.65) มีหมู่โลหิต Rh ลบ 5,469 (ร้อยละ 0.34) และมี weak-D 157 ราย (ร้อยละ 0.01) ผู้บริจาคโลหิต weak-D ได้กลับมาบริจาคโลหิตอีกจำนวน 81 ราย จึงได้นำตัวอย่างโลหิตมาทำการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจพบแอนติเจน D ของน้ำยา anti-D 6 ชนิด ที่ทดสอบกับ weak-D จำนวน 81 ราย พบว่าให้ผล

บวกแตกต่างกันคือ น้ำยา anti-D ของ NBC, Tulip, Totem, Bioclone, Newmarket และ Diamed ให้ผลบวก เมื่ออ่านผลที่อุณหภูมิห้อง เท่ากับร้อยละ 29.63, 41.98, 65.43, 34.57, 41.98, และร้อยละ 39.51 ตามลำดับ แต่การอ่านผลที่ IAT พบว่าน้ำยา anti-D ทั้ง 6 ชนิดสามารถตรวจพบแอนติเจน D ของ weak-D ได้ทั้งหมด 81 ราย

ตารางที่ 3 สรุปผลการตรวจแยกชนิด partial D categories โดยทดสอบ weak D จำนวน 81 รายด้วยชุดน้ำยาตรวจ D-Screen พบว่าสามารถแยกชนิดของ partial D categories ได้จำนวน 62 ราย (ร้อยละ 76.54) โดยเป็น DII 1 ราย (ร้อยละ 1.23) DIII

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนและร้อยละของ D categories ต่างๆ และ weak D จากการทดสอบกับชุดน้ำยาตรวจแยกชนิดของ Partial D (D-screen)

Partial D and weak D phenotypes	No of partial D categories detected (%)	
DII	1	(1.23%)
DIII	21	(25.93%)
DVI	30	(37.04 %)
DVII	5	(6.17%)
DFR	5	(6.17%)
Total No. of Partial D	62	(76.54%)
No. of unclassified (weak D)*	19	(23.46%)

* ผลของปฏิกิริยากับชุดน้ำยาแยกชนิด Partial D ไม่สามารถแยกเป็น D categories ใดๆ

ตารางที่ 4 แสดงจำนวน D categories ต่างๆ ที่ตรวจพบโดยการอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทดสอบกับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D ทั้ง 6 บริษัท

D categories cells (No.)	D categories cells detected at room temperature					
	DII 1	DIII 21	DVII 5	DFR 5	DVI 30	Weak D 19
Monoclonal anti-D (IgM+IgG)						
NBC	1	17	4	0	0	2
Tulip	1	20	4	3	1	5
Totem	1	19	5	4	18	6
Bioclone	1	18	5	1	0	3
Newmarket	1	19	5	1	1	7
DiaMed	1	18	5	1	1	6

21 ราย (ร้อยละ 25.93) DVI 30 ราย (ร้อยละ 37.04) DVII 5 ราย (ร้อยละ 6.17) และ DFR 5 ราย (ร้อยละ 6.17) ส่วนอีก 19 ราย (ร้อยละ 23.46) มีผล pattern ของปฏิกิริยา ไม่ตรงกับ D categories ใดๆ ในตาราง จึงแปลผลเป็น weak D โดยส่วนใหญ่เป็นเม็ดเลือดแดง ที่ให้ผลบวกอ่อนเมื่อทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนัล anti-D ทั้งที่อุณหภูมิห้อง และหรือ ที่ antiglobulin test

ตารางที่ 4 แสดงจำนวน D categories ต่างๆ ที่ตรวจพบและนำมาทดสอบกับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D ทั้ง 6 บริษัท โดยการอ่านผลที่อุณหภูมิห้องและให้ผลบวก พบว่ามี DII จำนวน 1 ราย ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ทั้ง 6 บริษัท ใน DIII จำนวน 21 ราย ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ NBC, Tulip, Totem, Bioclone, Newmarket และ DiaMed จำนวน 17, 20, 19, 18, 19 และ 18 ราย ตามลำดับ ใน DVII จำนวน 5 ราย ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ NBC และ Tulip จำนวน 4 รายและกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ Totem, Bioclone,

Newmarket และ DiaMed จำนวน 5 ราย ใน DFR จำนวน 5 ราย ไม่มีรายใดให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ NBC แต่ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ Tulip, Totem, Bioclone, Newmarket และ DiaMed จำนวน 3, 4, 1, 1 และ 1 ราย ตามลำดับ ใน DVI จำนวน 30 ราย ไม่มีรายใดให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ NBC และ Bioclone แต่ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ Tulip, Totem, Newmarket และ DiaMed จำนวน 1, 18, 1 และ 1 ราย ตามลำดับ สำหรับ weak D จำนวน 19 ราย ให้ผลบวกกับ โมโนโคลนัล anti-D ของ NBC, Tulip, Totem, Bioclone, Newmarket และ DiaMed จำนวน 2, 5, 6, 3, 7 และ 6 ราย ตามลำดับ

ตารางที่ 5 แสดงปฏิกิริยาของ DII, DIII, DVII, DFR, DVI และ weak D เมื่อทดสอบกับน้ำยา โมโนโคลนัล anti-D ทั้ง 6 ชนิด และกับชุดน้ำยาตรวจ D-Screen พบว่า partial D categories ต่างๆ จะให้ผลบวกที่มีความแรงแตกต่างกันแม้จะอยู่ใน D category

ตารางที่ 5 แสดงปฏิกิริยาของ Partial D categories และ weak D เมื่อทดสอบกับชุดน้ำยาตรวจแยกชนิดของ partial D(D-Screen)

Monoclonal anti-D															D-Screen (Identification kit for partial Rhesus D)													
Sample No.	1			2			3			4			5			6			1	2	3	4	5	6	7	8	9	Partial D Categories
	NBC		RT	Tulip		RT	Totem		RT	Bioclone		RT	Newmarket		RT	DiaMed		RT										
55	w	2+	w	2+	2+	1 ^s	2+	w	2+	w	2 ^s	2+	3+	2+	1 ^s	2+	3+	1+	3+	1+	2+	1+	0	2+	2+	2+	DII	
16	2+	1 ^s	4+	3+	3+	4+	3+	3+	4+	3+	4+	2+	4+	2+	2 ^w	2+	4+	1+	3 ^s	3+	3+	1+	2+	3 ^s	3+	3+	DIII	
51	w	w	1+	w	w	1+	w	w	1 ^s	w	1+	w	1+	w	1 ^s	w	1+	W	1+	1+	1+	W	W	1+	2+	1+	DIII	
32	w	w	4+	1 ^s	1+	4+	w	w	4+	1+	3+	1+	4+	2+	2+	1+	4+	1+	3+	2+	3+	0	1+	4+	4+	4+	DVII	
37	0	0	4+	0	0	w	3+	3+	3+	0	4+	0	4+	0	0	0	4+	0	0	3+	0	0	2 ^s	2+	2+	2 ^s	DFR	
23	0	0	3+	0	0	2+	3+	3+	4+	0	1+	0	4+	0	0	0	4+	0	0	0	0	0	4+	0	0	0	DVI	
54	0	0	2+	0	0	w	w	w	1+	0	1+	0	2+	0	0	0	3+	0	0	0	0	0	3+	0	0	0	DVI	
19*	0	0	w	0	0	w	0	0	0	0	0	w	w	0	0	0	w	0	0	0	0	0	0	1+	1+	1+	Weak D	
53*	w	w	1+	w	w	w	w	w	w	w	1+	1+	1+	1+	1+	w	1+	0	2+	W	1+	0	0	0	2+	2 ^s	1+	Weak D

* ผลของปฏิกิริยากับชุด D-screen ไม่ชัดเจนจึงไม่สามารถจัดอยู่ใน category ใดๆได้

เดียวกัน เช่น DIII (No.16 และ 51) ให้ผลบวก ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง แต่มีความแรงแตกต่างกัน DIII No.16 ให้ผลบวกอย่างแรงกับน้ำยา anti-D ของ Tulip, Totem และ Bioclone ซึ่งสามารถแปลผลเป็นหมู่ Rh บวกได้ ขณะที่ DIII No.51 ให้ผลบวกอ่อนกับน้ำยา anti-D ทั้ง 6 บริษัท สำหรับ DFR และ DVI น้ำยา anti-D ส่วนใหญ่อ่านผลเป็นลบที่อุณหภูมิห้องและ 37°C แต่ที่ antiglobulin test จะให้ผลบวกแรง สำหรับ weak D ส่วนใหญ่จะให้ผลบวกอย่างอ่อนกับน้ำยา anti-D ทั้งหมด ทั้งที่อุณหภูมิห้อง 37°C และที่ antiglobulin test

วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดสอบในตารางที่ 2 โมโนโคลนัล anti-D ทั้ง 6 บริษัท ทำปฏิกิริยากับ weak D และ partial D categories ต่างๆ และให้ผลเป็นบวกได้แต่มีความแรงของปฏิกิริยาแตกต่างกันในการอ่านผลที่อุณหภูมิห้อง และที่ antiglobulin test ซึ่งเกิดเนื่องจากการผลิตใช้แอนติบอดีจากเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-D แตกต่างกันรวมทั้งมีความเข้มข้นและ avidity ของโมโนโคลนัล anti-D ต่างกันด้วย ดังนั้นถึงแม้ว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D จะมีประสิทธิภาพสูงเหมาะสมในการใช้ตรวจหมู่โลหิต Rh ในผู้บริจาคโลหิต แต่เนื่องจากมีความแตกต่างกันดังกล่าวในการตรวจหาแอนติเจน D ในผู้บริจาคโลหิต จึงจำเป็นต้องทดสอบถึง antiglobulin test เสมอทั้งนี้ เพื่อให้มั่นใจว่าผู้บริจาคโลหิต weak D หรือ partial D categories ต่างๆ ซึ่งถือว่ามีความเสี่ยง D ห้ามนำไปให้ผู้ป่วย Rh ลบ เพราะอาจกระตุ้นให้ผู้ป่วย สร้าง anti-D ได้ดังที่มีรายงานมาแล้ว¹⁶

ในระบบ Rh แอนติเจน D มีความแตกต่างหลากหลายทั้งทางด้านปริมาณ และด้านคุณภาพ เนื่องจากแอนติเจน D เป็น mosaic ประกอบด้วยหลาย epitopes การตรวจแยกชนิด partial D category มีความซับซ้อนมาก ในอดีตการแยก partial D categories ต่างๆ จะทำในผู้ที่ เป็น RhD บวกและสร้าง alloanti-D ในซีรัม โดยใช้เม็ดเลือดแดงและซีรัมของ partial D เหล่านี้มาทำปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-testing) ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคในการตรวจ partial D categories ต่างๆ คือ การขาดแคลน ซีรัม alloanti-D ที่สร้างโดยผู้ที่ เป็น partial D ซึ่งมีปริมาณจำกัด อีกทั้งเมื่อเก็บซีรัมไว้นาน alloanti-D ก็เสื่อมและสูญเสียคุณภาพ ทั้งพบว่า alloanti-D ที่สร้างจากคน partial D category เดียวกันจะไม่ทำปฏิกิริยากับ Partial D category นั้นๆ แต่จะทำปฏิกิริยากับ partial D categories อื่นๆ ให้ผลแตกต่างกัน คือไม่มีความจำเพาะต่อ D epitope ที่เหมือนกันดังนั้น เมื่อการผลิตโมโนโคลนัล anti-D ประสบผลสำเร็จ สามารถผลิตได้ตลอดไปและไม่จำกัดปริมาณรวมทั้งโมโนโคลนัล anti-D แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อ D

epitope ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเหล่านี้แยก partial D categories ในผู้บริจาคโลหิตหรือผู้ป่วย weak D ดังมีรายงานการศึกษาอุบัติการณ์ของ D VI ในผู้บริจาคโลหิตทั่วไปที่ไม่มี alloanti D ในซีรัม^{17,18}

ผลการตรวจแยก partial D categories ในตารางที่ 3 พบว่า DVI category เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่ม partial D ทั้งหมด รองมาคือ DIII, DVII, DFR และพบ DII น้อยเพียง 1 ราย เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ การศึกษา partial D category ต่างๆ ในคนผิวขาว ผิวดำ และชาวญี่ปุ่น ของ Tippett และคณะ¹⁷ ต่างกันที่ Tippett และคณะ พบ DV จำนวนมาก แต่การศึกษาในผู้บริจาคไทยครั้งนี้ ไม่พบ DV เลย จากข้อมูลของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยพบว่ามี weak D ในผู้บริจาคโลหิตทั้งหมดร้อยละ 0.01 และตรวจพบ DVI ร้อยละ 37.04 ของ weak D ซึ่งเท่ากับร้อยละ 0.0037 ซึ่งน้อยกว่าอุบัติการณ์ของ DVI ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตของประเทศอังกฤษ เนเธอร์แลนด์ และเยอรมันซึ่งพบร้อยละ 0.02, 0.05 และ 0.015 ตามลำดับ^{18,19,20} ซึ่งอาจเป็นเพราะในประเทศเหล่านี้มี weak D มากกว่าคนไทย คือร้อยละ 0.3-0.7 นอกจากนี้ การศึกษาายังให้ผลสอดคล้องกันคือพบ DVI มากที่สุด

ในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 เนื่องจาก DII, DIII และ DVII ซึ่งมีแอนติเจน D epitopes ขาดหายไปเพียง 1-2 epitopes (ตารางที่ 6) partial D เหล่านี้จึงให้ผลบวกกับ anti-D ในการปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้อง และ DIII จำนวน 4 ราย เช่น No.16 สามารถแปลผลเป็นหมู่ RhD บวกได้เมื่อทดสอบกับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D บางบริษัท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DIII มีแอนติเจน D epitopes ครบทั้ง 9 epitopes ให้ผลบวกกับ anti-D ของชุดตรวจ D-Screen ทั้งหมด จึงไม่สามารถแยกจาก RhD บวกปกติได้สำหรับ DFR และ DVI ส่วนใหญ่ให้ผลลบกับน้ำยา anti-D ที่อุณหภูมิห้อง แต่ให้ผลบวกแรงที่ antiglobulin test เนื่องจาก D epitopes ขาดหายไปจำนวนมากถึง 5 และ 6 epitopes ทั้งยังขาด epitopes ที่มีความเป็น immunogenicity มากที่สุดของแอนติเจน D คือ ep 6/7 (แสดงในตารางที่ 6) ปัจจุบันน้ำยาชนิดโมโนโคลนัล anti-D (IgM+IgG) ผู้ผลิตจะเลือกโคลนของเซลล์ที่สร้าง anti-D IgM ที่ทำปฏิกิริยาให้ผลบวกโดยการอ่านผลที่อุณหภูมิห้องกับเซลล์ Rh บวก และ partial D ที่ขาด D epitopes เพียงเล็กน้อย เช่น DV และ DVII ผสมกับ anti-D IgG ที่จะทำปฏิกิริยากับ partial D ที่ขาด D epitopes มากๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ที่ขาด ep 6/7 เช่น DVI และ DFR จึงให้อ่านผลบวกที่ antiglobulin test เท่านั้น เพื่อให้เหมาะสมที่จะใช้ตรวจหาหมู่โลหิต RhD ทั้งในผู้บริจาคโลหิต และในผู้ป่วย

ตารางที่ 6 แสดง D epitope ที่ปรากฏ และ epitope ที่ขาดหายไปจากจำนวน 9 epitopes ของ Partial D category ต่างๆ เมื่อทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนัล anti-D ²¹

Partial D	Epitopes present	Epitopes absent
II	1,2,3,5,6/7,8	4,9
III	1,2,3,4,5,6/7,8,9	Must be othersmissing
IVa	4,5,6/7,8	1,2,3,9
IVb	5,6/7,8	1,2,3,4,9
Va	2,3,4,6/7,8,9	1,5
VI	3,4,9	1,2,5,6/7,8
VII	1,2,3,4,5,6/7,9	8
DFR	1,2,3,4,5,6/7,9	2,5,6/7,8
DBT	6/7,8	1,2,3,4,5,6/7,9
HMi	2,3,4,5,6/7,9	1,2,3,5,8,9
HMii	1,2,3,4,5,6/7,8,9	5,6/7
R ₀ ^{Har}	5,6/7,8	1,2,3,4,5,6/7,9
Lines	2,3,5,6,6/7,8,9	1,2,4,5,7

- Epitopes underlined may be present or absent due to behaviour of different monoclonal anti-D with further partial D types indicating splits of these epitopes.

ในตารางที่ 5 การที่ partial D category เดียวกันแต่ให้ผลบวกความแรงของปฏิกิริยากับน้ำยาโมโนโคลนัล anti-D แตกต่างกันนั้น นอกจากเกิดจากการมีปริมาณแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงแตกต่างกัน แล้วยังเกิดจากการที่แอนติเจน D epitope มีการทับซ้อนกัน (overlap) และ partner gene complex ของ D นั้นทำให้อ่าน ได้ผลบวกอ่อนด้วย เช่น D^{VI}Ce จะทำปฏิกิริยาให้ผลบวก กับโมโนโคลนัล anti-D แรงกว่า D^{VI}cE เป็นต้น¹⁷

การศึกษาอุบัติการณ์ของ partial D categories ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต weak D โดยใช้ชุดน้ำยา D-Screen ซึ่งประกอบด้วย โมโนโคลนัล anti-D จาก 9 cell lines มีทั้ง anti-D IgM และ anti-D IgG เป็นการตรวจหาแอนติเจน D epitopes ที่ปรากฏหรือขาดหายไปบนผิวเม็ดเลือดแดงนั้น สามารถตรวจแยกชนิด partial D categories ต่างๆ ได้ และพบว่า DVI เป็น category ที่พบได้มากที่สุด แต่เนื่องจาก weak D มีปริมาณแอนติเจน D site จำนวนน้อยบนผิวเม็ดเลือดแดง ไม่สามารถทดสอบได้ด้วยเทคนิคทาง serology รวมทั้ง DIII ที่ให้ผลบวกกับน้ำยา anti-D ทุกบริษัท ดังนั้นการตรวจแยกชนิด partial D categories และ weak D ให้ถูกต้องยิ่งขึ้นต้องอาศัยการตรวจในระดับโมเลกุลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจินตนา ทับรอด อดีตหัวหน้าหน่วยปฏิบัติการเม็ดโลหิตแดงฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรุ่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ที่

กรุณาให้ข้อมูล weak D ในผู้บริจาคโลหิตที่ได้ทำการศึกษาไว้ในระยะแรก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Stratton F. A New Rh Allelomorph. *Nature*,1946;158:25-6.
2. Widman FK chair and editor. Rh system, Technical Manual. 9th edition. Karger:American Association of Blood Banks 1985:133.
3. Argall CI, Ball JM, Trenelman E. Presence of anti-D antibody in the serum of a D⁺ patient. *J Lab Clin Med* 1953;41:895.
4. Tippett P. Subdivisions of the Rh (D) antigen. *Med Lab Sci* 1988;5:88-93.
5. Brecher ME chair and editor. Rh system, Technical Manual 15th edition. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks 2008:322-3.
6. Tippett P, Sanger R. Future observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Arztl Lab* 1977;23:476-80.
7. Lomas C, Bruce M, Watt A, et al. Tar+ individuals with anti-D, a new category DVII. *Transfusion* 1986;26:560.
8. Lomas C, Tippett P, Thompson KM, Melamid 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.
9. Lomas C, McColl K, Tippett P. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. *Transf Medicine* 1993;3:67-9.

10. Scott ML, Voak D, Jones J, et al. A model for RhD- the relationship of 30 serologically defined epitopes to predicted structure. *Biotest Bull* 1997;5:459-66.
11. Lomas C, Grassman W, Ford D, Watt, et al. FPTT is a low-incidence Rh antigen associated with a 'new' partial Rh D phenotype, DFR. *Transfusion* 1994; 34:612-6.
12. Jones J. Identification of two new D variants, D^{Hmi} and D^{Hmi} using monoclonal anti-D. *Vox Sang* 1995;69:236-41.
13. Beckers EAM, Porcelijn L, Ligthart P, et al. The R₀^{Hat} antigenic complex is associated with a limited number of D epitopes and allo anti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion* 1996;36:104-8.
14. Jones J, Filbey D. Selection of monoclonal antibodies for the Identification of D variants: Ability to detect weak D and to split epD2, epD5 and epD6/7. *Vox Sang* 1996;70:173-9.
15. ศันย์ สกุดดำรงค์พานิช, จินตนา ทับรอด, สาริกา แสงกล้า และ อุดม ตั้งต้อย การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา anti-D ในการตรวจหมู่โลหิต Rh D. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต* 1999;9:39-47.
16. Stroup M. Controversies in Transfusion Medicine. D^u testing: *Pro. Transfusion* 1991;3:273-6.
17. Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: Partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang* 1996;70:123-31.
18. Van Rhenen DJ, Thijssen PMHJ, Overbeeke MAM. Serological characteristics of partial D antigen category VI in 8 unrelated blood donors. *Vox Sang* 1996;66:133-6.
19. Leader KA, Kumpel BM, Poole GD, et al. Human monoclonal anti-D with reactivity against category D^{VI} cells used in blood grouping and determination of the Incidence of the category D^{VI} phenotype in the D^u population. *Vox Sang* 1990;58:106-11.
20. Flegel WA, Waggner FF. The Frequency of RhD protein variances in Caucasians. *Transfusion Clinique et Biologique* 1996;3,3S:10s, abstract.
21. Jones JW, Voak D, Scott ML, Sonnelborn HH. Policies for the selection of RhD typing reagents. *Biotest Bull* 1997;5:485-94.

Incidence of Partial D Categories in Thai Blood Donors

Sarika Makechay, Achara Siripongsanusit and Tassanee Sakuldamrongpanich

Department of Antiserum and Standard Cells Preparation, National Blood Center, Thai Red Cross Society

Abstract : Objective : To study the incidence of partial D categories in weak D blood donors of The National Blood Centre, Thai Red Cross Society. **Material and Method :** Eighty one samples of weak D (D^u) cells were tested against 6 different monoclonal anti-D (IgM+IgG) reagents to demonstrate the efficacy of anti-D by testing against a panel of monoclonal anti-D (D-Screen) for identification of partial D categories. **Results :** All of the 81 weak D samples gave positive reaction against six monoclonal anti-D but gave different grade of agglutination results at both room temperature and antiglobulin tests. When tested with D-Screen kit, 62 samples could be classified into the various D categories : 1 DII (1.23%), 21 DIII (25.93%), 30 DVI (37.04%), 5 DVII (6.17%), 5 DFR (6.17%) and 19 samples (23.46%) exhibited a reaction profile which did not match to any partial D patterns, were classified as weak D. **Discussion/Conclusion :** The D-Screen kit was sufficient to identify the partial D category. The DVI cell was the most common category found and DIII gave positive results with all anti-D tested. Therefore, it is unable to distinguish from normal D positive cells as well as some weak D cells. The molecular biology technique should be used to identify these partial D and weak D cells.

Key Words : ● Weak D ● Partial D categories ● D epitopes
● D-Screen kit for identification of partial D cells

J Hematol Transfus Med 2010;20:105-12.