

บทความทั่วไป

ABO discrepancies: ข้อสังเกตและแนวทางการแก้ไขปัญหา

ปริยานาถ วงศ์จันทร์*

บทนำ

ABO discrepancies เป็นปัญหาหนึ่งที่พบบ่อยในงานธนาคารเลือด และสำหรับนักเทคนิคการแพทย์ที่มีพื้นฐานด้านภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก โลหิตวิทยาและงานธนาคารเลือดมาแล้ว จัดเป็นงานที่ทำหยาบมากเพื่อพิสูจน์เพื่อให้รู้สาเหตุ รู้แนวทางวิธีการตรวจเพื่อตอบคำถาม ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยเองโดยตรงและเป็นแนวทางช่วยวินิจฉัยของแพทย์ บทความนี้ถ่ายทอดจากหนังสือ Basic and applied concepts of immunohematology ปี 2000 ซึ่งเป็นแนวทางปฏิบัติของงานธนาคารเลือดในอเมริกา ดังนั้นในหลายๆ ประเด็น จึงควรอ่านและพิจารณาเรื่องความเหมาะสมกับสถานการณ์บ้านเรด้วย อย่างไรก็ตามยังสามารถใช้หลักการเดียวกันในด้านการปฏิบัติและแนวคิดวิเคราะห์

รู้ได้อย่างไรว่าเกิด ABO discrepancies?

ง่ายที่สุดคือสังเกตลักษณะของปฏิกิริยาใน cell grouping (Forward grouping) และ serum grouping (Reverse grouping) ไม่สอดคล้องกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าห้องปฏิบัติการใดที่ตรวจหมู่เลือดระบบ ABO ด้วยวิธี cell grouping เพียงอย่างเดียว จะไม่สามารถรู้ได้เลยว่ามี ABO discrepancies เกิดขึ้น นอกจากผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันแล้ว ยังมีข้อสังเกตอื่นได้แก่

1. ความแรงของปฏิกิริยาผิดไปจากที่ควรเป็น นั่นคือ ปฏิกิริยาอ่อนลงกว่าปกติ ดังนั้นข้อนี้จะได้เห็นได้ว่า

ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความพื้นฐานความรู้ว่าปกติการทำ cell grouping ความแรงของปฏิกิริยาควรอยู่ที่ประมาณ 3^+ - 4^+ และ serum grouping กับ A cell หรือ B cells ควรอยู่ที่ประมาณ 2^+ - 4^+ ดังนั้น เมื่อตรวจแล้วผลที่ได้ให้ความแรงของปฏิกิริยาอ่อนกว่านี้ ก็อย่าละเลยไป พึงตั้งข้อสังเกตไว้

2. ปฏิกิริยาหายไปหรือตรวจไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ทั้งที่ควรมี เช่น หมู่เลือดโอ ซึ่งหากทำ serum grouping ควรให้ผลบวกกับเซลล์ทั้ง A cells และ B cells แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ A1 cells หรือ B cells อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้งสองอย่าง เป็นต้น

3. มีปฏิกิริยาแปลกๆ เกิดขึ้นในหลอดทดสอบ เช่น mixed field agglutination เป็นต้น

ความผิดปกติอาจเกิดขึ้นในแบบใดแบบหนึ่ง หรือหลายลักษณะพร้อมกันก็ได้ ดังนั้นเมื่อพบหรือสังเกตความผิดปกติ ควรมีลำดับขั้นตอนในการตรวจพิสูจน์ เริ่มตั้งแต่ความผิดพลาดทางเทคนิค ซึ่งตรวจสอบได้ง่ายที่สุดและสามารถแก้ไขได้ง่าย ก่อนที่จะพิสูจน์ในขั้นตอนยุ่งยากอื่นๆ

ก. ความผิดพลาดทางเทคนิคในการตรวจ หมู่เลือดระบบ ABO

ลักษณะของความผิดพลาดทางเทคนิคและแนวทางการแก้ไขประกอบด้วย

1. ความผิดพลาดของเอกสารและการ

Keywords: ABO discrepancies, forward grouping, reverse grouping, mixed field agglutination

* แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จำแนกเอกลักษณ์บุคคล ซึ่งพบได้บ่อย เช่นหยิบตัวอย่างเลือดผิด หรือเขียนชื่อสกุลผิด เป็นต้น เพื่อป้องกันความผิดพลาดในลักษณะนี้ควรปฏิบัติงานอย่างรอบคอบกับตัวอย่างเลือด ตรวจสอบชื่อ สกุล เลขที่โรงพยาบาล ฯลฯ ที่เป็นการระบุบุคคล ให้ตรงกันระหว่างใบขอตรวจและตัวอย่างเลือดในทุกหลอด เมื่อตรวจได้ผลอย่างไรให้บันทึกอย่างถูกต้อง ชัดเจน การอ่านผลปฏิกิริยาต้องถูกต้องและมีการบันทึกในทุกครั้ง ทำอย่างนี้เสมอจะช่วยลดความผิดพลาดในส่วนนี้ได้เป็นอย่างดี

2. ความผิดพลาดของน้ำยาและอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ เช่นความเข้มข้นของเซลล์ไม่ได้มาตรฐานเลือดที่นำมาเตรียมหมด หรือใกล้หมดอายุ แอนติบอดีหรือ reagent red cells หมดอายุหรือใกล้หมดอายุ เครื่องปั่นหรืออ่างน้ำอุ่นไม่ได้มาตรฐาน เป็นต้น ข้อผิดพลาดในลักษณะนี้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งสิ้น เพื่อป้องกันความผิดพลาดในลักษณะนี้ ควรมีการตรวจสอบคุณภาพประจำวันอย่างสม่ำเสมอ ตรวจสอบการปนเปื้อนของแอนติบอดี หรือ reagent red cells สังเกตความขุ่น หรือมี hemolysis สุดท้ายคือการตรวจสอบอุปกรณ์โดยเฉพาะเครื่องปั่น ต้องมีการเปรียบเทียบกับมาตรฐานเป็นประจำ

3. ความผิดพลาดในขั้นตอนการปฏิบัติงาน ส่วนใหญ่เป็นเพราะทำงานไปนานๆ จนเกิดความชำนาญทำให้ประมาทเลินเล่อ ปฏิบัติการไม่ครบทุกขั้นตอน หรือไม่ทำในบางขั้นตอน เนื่องจากเพราะไม่ตระหนักถึงความสำคัญ หรือยังไม่เกิดปัญหาให้ต้องแก้ไข เพื่อป้องกันความผิดพลาดในข้อนี้ ควรปฏิบัติงานตามวิธีมาตรฐานที่กำหนดไว้ (Standard operating procedure หรือ SOP) เช่นการปฏิบัติงาน หรือเตรียมน้ำยาตามวิธีการที่กำหนดไว้โดยบริษัทผู้ผลิต เลือกใช้น้ำยาหรือเม็ดเลือดแดงที่ถูกต้องกับงานที่ทำ เช่น ชนิด หรือความเข้มข้น หรือ

แม้แต่การเขย่าหลอดเพื่ออ่านผล วิธีที่ถูกต้องคือเขย่าหลอดทดสอบเบาๆ จนเม็ดเม็ดกระดุมของเซลล์หลุดจากกันหลุด จึงอ่านและบันทึกผลทีละหลอด (one tube at one time) มิใช่เขย่าอย่างแรง (จะไม่สามารถเห็นหรืออ่านความแรงของปฏิกิริยาที่ถูกต้องได้) หรืออ่านพร้อมกันทีละ 3-4 หลอดและจำไว้ในใจ จากนั้นจึงลงผล วิธีนี้ไม่ถูกต้อง และไม่พึงปฏิบัติเป็นอย่างยิ่ง เพราะงานธนาคารเลือดไม่ใช่เลขคณิตคิดในใจ หรือนั่งทางในระลึกชาติว่าหลอดใดอ่านว่าอย่างไร หลายคนคงยังจำได้ว่า “งานธนาคารเลือดไม่มีสิทธิทำผิดพลาด เพราะจะหมายถึงชีวิตของผู้ป่วยได้”

ข. ความผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างส่งตรวจมีปัญหา

สามารถแบ่งออกเป็นสองลักษณะ คือเม็ดเลือดแดงมีปัญหา และซีรัมที่ส่งตรวจมีปัญหา หรือทั้งสองกรณี วิธีการที่จะรู้ว่าจะอะไรเป็นอะไร ต้องสังเกตก่อนว่า cell grouping หรือ serum grouping ให้ปฏิกิริยาผิดไปจากปกติ จากนั้นจึงเริ่มต้นจากมุมมองนั้น ไม่ว่าเม็ดเลือดแดงหรือซีรัม มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอ่านปฏิกิริยาและการเกิด ABO discrepancies ได้ทั้งสิ้น แต่โดยทั่วไปแล้วมักพบมีปัญหาด้าน serum grouping กล่าวคือเป็นเพราะไม่มีแอนติบอดี หรือมีในปริมาณที่ต่ำมากจนตรวจพบไม่ได้ จึงไม่เกิดปฏิกิริยาให้เห็น และโดยปกติผู้ปฏิบัติงานควรอ่านผลใน cell grouping เสียก่อน จากนั้นจึงอ่านปฏิกิริยาใน serum grouping แล้วนำผลจากสองส่วนมาประมวลผลว่า สอดคล้องกันหรือไม่อย่างไร ก่อนที่จะดำเนินขั้นตอนอื่นๆ ที่ยุ่งยากต่อไป ปัญหาต่างๆ ที่สามารถเกิดขึ้นได้กับทั้งเม็ดเลือดแดง หรือซีรัม ที่นำมาตรวจทำให้เกิดปฏิกิริยาผิดสังเกต ส่งผลต่อการอ่านปฏิกิริยาและสรุปผล แสดงไว้ในกล่องข้อความด้านล่าง

ปัญหาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบเม็ดเลือดแดง	ปัญหาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบซีรัม
Extra antigens Acquired B phenotype B(A) phenotype Polyagglutination Rouleaux Missing or weak antigen ABO subgroup Pathologic etiology Mixed field reactions Transfusion of group O to A, B or AB Bone marrow or stem cell transplants A ₃ phenotype	Extra antibodies A subgroup with anti-A1 Cold alloantibodies Cold autoantibodies Rouleaux Missing or weak antibodies Newborn Elderly population Pathologic etiology

ต่อไปนี้จะขอยกตัวอย่าง ABO discrepancies แบบต่างๆ เพื่อเป็นกรณีศึกษา ช่วงแรกจะกล่าวถึงความผิดปกติที่เกี่ยวข้องหรือเป็นผลจากเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถสังเกตความผิดปกติได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) มีแอนติเจนแปลกๆ บนเม็ดเลือดแดง 2) ไม่มีแอนติเจนนั้นๆ บนเม็ดเลือดแดง หรือ 3) เกิดปฏิกิริยาชนิด mixed field agglutination

ABO discrepancies ที่เกิดใน cell grouping หรือ forward grouping

กรณีตัวอย่างจากการมีแอนติเจนแปลกๆ บนเม็ดเลือดแดง (Extra antigen presentation)

กรณีที่ 1 Acquired B phenotype พบได้ในบุคคลที่มีหมู่เลือด A แต่เม็ดเลือดแดงสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ anti-B antibody เมื่อทำ cell grouping ผลที่ได้จะไม่สอดคล้องกับ serum grouping เนื่องจากอ่านผลได้เป็นหมู่ AB ดังแสดงในตาราง

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
4 ⁺	1 ⁺	neg	4 ⁺

หมายเหตุ RBCs: Red blood cells

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. อ่านผล cell grouping กับ anti-A ให้ผลบวกแรง (4⁺)
2. อ่านผล cell grouping กับ anti-B ให้ผลบวกอ่อน (1⁺) กว่าปกติ ซึ่งควรเป็น 4⁺ จากทั้งข้อ 1 และ 2 ควรอ่านผลหมู่เลือดเป็นหมู่ AB
3. อ่านผล serum grouping ให้ผลเป็นหมู่เลือด A ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลที่อ่านได้ใน cell grouping

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

ในรายนี้สรุปว่าเป็นหมู่ A ซึ่งยืนยันด้วยผล serum grouping ที่ระบุว่า anti-B บุคคลดังกล่าวนี้มี acquired B phenotype อันเป็นผลจากมี extra antigen ปรากฏบนเม็ดเลือดแดง ปริมาณที่ปรากฏมีน้อยจึงให้ผลบวกกับ anti-B ในความแรงที่อ่อนกว่า

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

Acquired B มักพบได้ในบุคคลบางรายที่มีหมู่โลหิต A และเกิดโรคหรือพยาธิสภาพของทางเดินอาหารส่วนล่าง เช่น มะเร็งของ colon หรือ rectum ลำไส้ดูดตัน หรือได้ติดเชื้อแบคทีเรีย ชนิดกรัมลบ กลไกเกิดจากการได้รับเอนไซม์กำจัดหมู่อะเซทิล (deacetylase) ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียเอง หรือเป็นผลจากพยาธิสภาพดังกล่าวข้างต้น และมีผลต่อ antigen A ซึ่งมีหมู่น้ำตาล N-acetylgalactosamine เป็น immunodominant sugar เมื่อหมู่อะเซทิลถูกตัดออก ได้ผลเป็น D-galactose ซึ่งเป็นตำแหน่งสำคัญของ antigen B

ดังนั้นจึงสามารถทำปฏิกิริยาข้าม (cross-react) ได้กับ anti-B เพียงมีข้อสังเกตคือปฏิกิริยาอ่อนกว่า เนื่องจากการ deacetylase ไม่ได้ตัดหมู่อะเซทิลในทุกตำแหน่งของ antigen-A

ABO discrepancy ในลักษณะนี้ จะหายไปได้เมื่อปลอดจากพยาธิสภาพกลับคืนสู่ภาวะปกติ บุคคลดังกล่าวนี้หากจำเป็นต้องได้รับเลือด ควรใช้ส่วนประกอบของเลือดที่ตรงหมู่เท่านั้น คือหมู่เลือด A

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ชักประวัติความเจ็บป่วยของบุคคลดังกล่าว โดยเฉพาะพยาธิสภาพของระบบทางเดินอาหารส่วนล่าง
 2. ลองทำปฏิกิริยาระหว่างเม็ดเลือดแดงกับซีรัมของบุคคลนั้น (autocontrol) หากเป็น Acquired B แม้ว่า เม็ดเลือดแดงบุคคลนั้นจะสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ anti-B monoclonal antibody เกือบทุกบริษัท แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-B ที่มีในซีรัมของตนเอง คือให้ผลลบ
 3. ลองทำปฏิกิริยาระหว่างเม็ดเลือดแดงกับ anti-B ที่ระบุว่าไม่ทำปฏิกิริยากับ acquired B หรือทำปฏิกิริยากับ human polyclonal anti-B ซึ่งจะให้ผลลบ
- กรณีตัวอย่างจากการมีแอนติเจนแปลก ๆ บนเม็ดเลือดแดง (Extra antigen presentation)
- กรณีที่ 2 B(A) phenotype พบได้ในบุคคลที่มีหมู่เลือด B แต่เม็ดเลือดแดงสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ anti-A antibody เมื่อทำ cell grouping ผลที่ได้จะไม่สอดคล้องกับ serum grouping เนื่องจากอ่านผลได้เป็นหมู่ AB ดังแสดงในตาราง

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
1 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	neg

หมายเหตุ RBCs: Red blood cells

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. อ่านผล cell grouping กับ anti-A ให้ผลบวกอ่อน (1⁺)
2. อ่านผล cell grouping กับ anti-B ให้ผลบวกแรงตามที่ควรเป็น (4⁺)
3. อ่านผล serum grouping ให้ผลเป็นหมู่เลือด B ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลที่อ่านได้ใน cell grouping

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

สรุปว่าเป็นหมู่เลือด B(A) phenotype เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีแอนติเจนพิเศษเพิ่มขึ้นคือ antigen A จึงสามารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้ง anti-B และ anti-A แต่อย่างหลังให้ผลอ่อนกว่าที่ควรเป็น

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

นับแต่ที่มีการผลิต monoclonal antibody ที่มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้น ทำให้สามารถตรวจจับ antigen A หรือ antigen B ที่มีอยู่ในปริมาณน้อยๆ ได้เป็นอย่างดี

B(A) phenotype เป็นอีกตัวอย่างหนึ่งที่เป็นผลจากการใช้แอนติบอดีที่มีความไว คำอธิบายสำหรับกรณีนี้คือความผิดปกติจากการที่เอนไซม์ D-Galactosyltransferase ซึ่งนอกจากทำหน้าที่ในการนำน้ำตาล D-galactose ไปยัง H-precursor ได้แล้ว ยังสามารถนำน้ำตาลจำเพาะของ antigen A คือ N-acetylgalactosamine ไปยัง H-precursor ได้ด้วย แต่ในปริมาณน้อยๆ จึงทำให้มีการแสดง antigen A ปริมาณน้อยๆ บนเม็ดเลือดแดง และตรวจสอบได้ด้วย anti-A ที่มีความแรงและความไวสูง ปรากฏการณ์ในลักษณะนี้ หากตรวจเฉพาะ cell grouping จะอ่านได้ว่าเป็นหมู่เลือด AB แต่ผู้ที่ได้รับการฝึกฝนมาอย่างมีระบบ จะสังเกตได้จากความแรงของปฏิกิริยาที่ไม่เป็นอย่างที่เราควรเป็น คือควรให้ปฏิกิริยา 3⁺-4⁺ ใน cell grouping ความผิดปกติแบบนี้ไม่ได้เป็นหมู่ AB แท้ๆ เพราะบุคคลดังกล่าวไม่มี gene A การมีหมู่ N-acetylgalactosamine เป็นผลจากเอนไซม์ทำงานผิดพลาด ในทางกลับกัน โอกาสพบ A(B) phenotype ก็เป็นไปได้ และอธิบายด้วยกลไกเดียวกัน

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ก่อนอื่นให้ตรวจประวัติบุคคลนั้นๆ เกี่ยวกับพยาธิสภาพและประวัติการรับส่วนประกอบของเลือด
2. ทำ cell grouping โดยใช้ anti-A จากหลายบริษัทเปรียบเทียบกัน หรือใช้ human polyclonal anti-A เพื่อยืนยัน

กรณีตัวอย่างจากการมีแอนติเจนแปลกๆ บนเม็ดเลือดแดง (Extra antigen presentation)

กรณีที่ 3 Polyagglutination

คือการที่เม็ดเลือดแดงสามารถทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มได้กับซีรัมของทุกหมู่เลือด ในคนปกติทั่วไปมี anti-T อยู่แล้วในซีรัม แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของตนเอง เนื่องจาก T antigen ถูกซ่อนอยู่ แต่เมื่อใดก็ตามที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิด และเกิดการทำลายผนังเม็ดเลือดแดง ทำให้มีการเผยโมเลกุลของ T antigen บนผิวเม็ดเลือดแดง และสามารถทำปฏิกิริยาได้กับ anti-T ที่มีอยู่ในซีรัมของคนทุกหมู่

กรณีที่ 4 "Wharton's jelly in cord blood"

คือการตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี cell grouping ในสิ่งส่งตรวจที่เป็น cord blood เม็ดเลือดแดงอยู่ในซีรัมที่มีโปรตีนเรียกว่า Wharton's jelly ซึ่งเป็น gelatinous tissue ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่มอย่างไม่จำเพาะ หรือเรียกว่าเกิดผลบวกปลอมได้ในการตรวจกับแอนติบอดีใดๆ ดังนั้นการตรวจหมู่เลือดในตัวอย่าง cord blood จึงควรคำนึงถึงเรื่องนี้ด้วย

กรณีตัวอย่างที่เกิดจากการหายไปของแอนติเจนหมู่เลือด หรือปรากฏในปริมาณที่น้อยเกินไป

(Missing or weak expressed antigens)

กรณีนี้มีข้อสังเกตชัดเจนในการทำ cell grouping คือปฏิกิริยาอ่อน หรือหายไปจากที่ควรเป็น ลักษณะนี้จะพบได้ในกรณี ABO subgroup และการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO ในผู้ป่วย leukemia หรือ Hodgkin's disease

กรณีศึกษาเรื่อง Subgroup A

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
neg	neg	neg	3 ⁺

หมายเหตุ RBCs: Red blood cells

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. เมื่อตรวจ cell grouping ไม่เกิดการเกาะกลุ่มกับทั้ง anti-A และ anti-B น่าจะเป็นหมู่ O
2. เมื่อตรวจ serum grouping พบปฏิกิริยาเฉพาะกับ cell B ซึ่งแสดงว่าเป็นหมู่ A จะเห็นว่าไม่สอดคล้องกับ cell grouping

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

ผลการตรวจ serum grouping น่าจะเป็นหมู่ A แต่ cell grouping แสดงปฏิกิริยาที่น่าจะเป็นหมู่ O แสดงให้เห็นว่าบุคคลดังกล่าวเป็นหมู่เลือด A แต่ไม่มีการแสดงออกของ antigen A จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ anti-A แต่เป็นหมู่ O ที่ไม่มี anti-A antibody

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

การพบปฏิกิริยาอ่อนกว่าที่ควรเป็น หรือไม่เกิดปฏิกิริยา ส่วนใหญ่มักสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกับเรื่องของหมู่ย่อยของ A หรือ B

Subgroup ของ A พบได้ไม่มากนัก ไม่เกิน 1% ของประชากรหมู่ A แต่ก็ยังพบได้มากกว่า subgroup ของ B มีสาเหตุจาก N-acetylgalactosaminyltransferase ซึ่งกำหนดการสร้างโดย gene A ทำงานน้อยกว่าปกติ จำนวน antigen A บนผิวเม็ดเลือดแดงมีน้อย มีผลทำให้

ปฏิกิริยาอ่อน หรือบางกรณีไม่เกิดปฏิกิริยาเลยกับ anti-A

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ตรวจสอบประวัติการเจ็บป่วยและการได้รับส่วนประกอบของเลือด เป็นสิ่งแรก
2. ลองทำ cell grouping ซ้ำ โดยเพิ่มเวลาในการ incubate ให้นานขึ้น รวมถึงการใช้ human polyclonal anti-A,B หรือ monoclonal anti-A,B การเพิ่มเวลาอาจช่วยให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดได้มากขึ้น
3. หากทำ cell grouping โดยใช้ anti-A,B แล้วให้ผลบวก แสดงว่าเป็น Subgroup ของ A
4. หากทำ cell grouping โดยใช้ anti-A,B แล้วให้ผลลบ ให้พิสูจน์ทางอ้อม ด้วยเทคนิค Adsorption-Elution โดยใช้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ anti-A จากนั้น elute ออก ทดสอบ eluate ด้วย A cells หากเป็น group A จริงใน eluate ต้องมี anti-A อยู่ จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับ A cells ได้ กรณีนี้จะเรียกว่า A_{el} (el = elute)

Mixed field reactions

พบได้ในการตรวจ cell grouping ทั้งกับ anti-A หรือ anti-B ลักษณะที่พบคือมีการเกาะกลุ่มของเซลล์

ท่ามกลางเซลล์เดี่ยว (unagglutinated cells) เนื่องจากในตัวอย่างเลือดมีเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ได้รับเลือดไม่ตรงหมู่ (เช่น ผู้ป่วยหมู่ A, B หรือ AB ได้รับเลือดหมู่ O) หรือผู้ป่วย

ที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก หรือปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด หรือบุคคลที่มี A3 phenotype และผู้ป่วยที่มี Tn-polyagglutinable cells (เกิดจากการกลายของยีนที่กำหนดการสร้างเม็ดเลือดชนิดต่างๆ)

กรณีศึกษาเรื่อง Mixed field reactions

ผู้ป่วยหมู่เลือด B ได้รับเลือดหมู่เลือด O

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
neg	2 ⁺ mf	3 ⁺	neg

หมายเหตุ RBCs: Red blood cells, mf: mixed field

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. ให้สังเกตความแรงของปฏิกิริยากับ anti-B ว่าอ่อนกว่าที่ควรเป็นสำหรับ cell grouping
2. ในปฏิกิริยายังให้ลักษณะ mixed field เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
3. หากดู serum grouping ปฏิกริยาระบุว่าเป็นหมู่เลือด B

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

ผลจาก cell grouping และ serum grouping สรุปได้ว่าเป็นคนหมู่เลือด B ที่ได้รับเลือดหมู่ O ดังนั้นจึงมีเม็ดเลือดแดงสองกลุ่ม เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน B จะทำปฏิกิริยากับ anti-B แต่เม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคที่อยู่ปนนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-B จึงเกิดลักษณะของ mixed field ให้เห็น

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

ในหลายกรณีที่ไม่สามารถหาเลือดตรงหมู่ให้แก่ผู้ป่วยได้ จึงมีการให้เลือดหมู่ O ซึ่งจัดเป็น universal

donors ดังนั้นผู้ป่วยที่ได้รับเลือดหมู่ O จึงมีเม็ดเลือดแดงสองกลุ่มที่ต่างกันอยู่แน่นอนว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำเม็ดเลือดแดงไปทดสอบ จึงให้ผลที่ต่างกันในทุกทดสอบเดียวกันนั้น

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน (หากพบ mixed field reaction)

1. ตรวจสอบประวัติการเจ็บป่วยและประวัติการรับส่วนประกอบของเลือดเป็นอันดับแรก
2. ตรวจสอบประวัติการปลูกถ่ายไขกระดูกหรือเซลล์ต้นกำเนิด
3. ตรวจ ABO ซ้ำในตัวอย่างเลือดก่อนการรับส่วนประกอบของเลือด เพื่อชี้ให้เห็นความแตกต่าง (หากยังมีตัวอย่างเลือดเก็บไว้)

ABO discrepancies ที่เกิดใน serum grouping หรือ reverse grouping

Additional antibodies in serum

พบสิ่งผิดสังเกตในการตรวจ serum grouping

ที่ไม่สอดคล้องกับ cell grouping มักมีสาเหตุเกิดจากการไม่พบ anti-A และ/หรือ anti-B ในซีรัม ตามที่คาดไว้ว่าควรจะเป็น หรืออาจเกิดจากมีแอนติบอดีอื่น ๆ อยู่ในซีรัมนอกจาก anti-A และ/หรือ anti-B ได้แก่ cold alloantibodies, cold autoantibodies และการเกิด

rouleaux ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกับ anti-A หรือ anti-B

ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างของ ABO discrepancies ที่เกิดในส่วนของการ serum grouping

กรณีศึกษาที่ 1 บุคคลหมู่เลือด A1 ที่มี anti-A₁ antibody ในซีรัม

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
4 ⁺	neg	2 ⁺	4 ⁺

หมายเหตุ RBCs: Red blood cell

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. เมื่อดูที่ cell grouping ผลน่าจะเข้าได้กับหมู่เลือด A
2. เมื่อดูที่ serum grouping ผลน่าจะเข้าได้กับหมู่เลือด O

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

จาก serum grouping เห็นได้ว่ามีแอนติบอดีอื่นในซีรัมนอกจาก anti-B และให้ปฏิกิริยาอ่อนกว่าคือ 2+ แอนติบอดีนั้นอาจเป็น anti-A, cold alloantibody, cold autoantibody หรืออาจเกิดจาก rouleaux reaction ก็ได้

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ตรวจสอบประวัติความเจ็บป่วย การรักษาและประวัติการรับส่วนประกอบของเลือดเป็นอันดับแรก
2. ทดสอบเม็ดเลือดแดงกับ anti-A₁ lectin เพื่อดูว่าเป็นเรื่องของ subgroup ของ A หรือไม่ หากให้ผลลบกับ anti-A₁ lectin แสดงว่าเป็นหมู่เลือด A₂ ที่มี anti-A₁ antibody
3. นำซีรัมของผู้ป่วยทดสอบกับ A₁ cells และ A₂ cells 2-3 ราย เพื่อยืนยันว่าผู้ป่วยมี anti-A₁ จริง ซึ่งควรให้ผลลบกับ A₂ cells ดังแสดงในตาราง

Patient serum testing with					
A ₁ cells	A ₁ cells	A ₁ cells	A ₂ cells	A ₂ cells	A ₂ cells
2 ⁺	2 ⁺	2 ⁺	neg	neg	neg

สรุปคือผู้ป่วยมี A₂ phenotype ที่มี anti-A₁ ในซีรัม phenotype ทั้งหมด
ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ประมาณ 1-8% ของ A₂

กรณีศึกษาที่ 2 การพบ cold autoantibody และ cold autoantibody ในซีรัม

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
4 ⁺	4 ⁺	neg	1 ⁺

หมายเหตุ RBCs: Red blood cell

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. ผลการตรวจ cell grouping พบปฏิกิริยาแรงตามที่ควรเป็นและบ่งบอกว่าน่าจะเป็นหมู่เลือด AB
2. แต่เมื่อดูผลใน serum grouping กลับพบมี anti-B และให้ผลอ่อน ซึ่งหากเป็นหมู่ AB จริงตาม cell grouping ผลใน serum grouping ควรเป็นลบในการทำปฏิกิริยากับทั้งสองเซลล์

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

แสดงว่าเป็นหมู่ AB ที่ในซีรัมมีแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนใดๆ บน B cell และแอนติบอดีดังกล่าวเป็น cold antibody เนื่องจากทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่จะเป็น allo- หรือ autoantibodies ต้องพิสูจน์ต่อไป

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

ไม่ว่าจะเป็นผู้บริจาคหรือผู้ป่วยนอกเหนือจากการพบ Natural occurring antibodies แล้ว บางรายอาจพบแอนติบอดีอื่นๆ ปะปนอยู่ด้วยและเป็นชนิด cold antibodies คือสามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่นำมาตรวจสอบด้วย serum grouping ที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ cell A หรือ cell B ที่นำมาใช้เตรียมเป็น reagent red cells บังเอิญมีแอนติเจนที่ตรงกันอยู่ด้วย จึงทำให้เกิด

ปฏิกิริยานอกเหนือจากปฏิกิริยาของระบบ ABO ตัวอย่างของแอนติบอดีดังกล่าวได้แก่ anti-P₁, anti-M, anti-N, anti-Le^a และ anti-Le^b เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำทั้ง cell และ serum grouping ควบคู่กันไป โดยเฉพาะในการทำ serum grouping หากมีการใช้ cell O₁, cell O₂ ร่วมด้วย ยิ่งเป็นข้อดี เพราะเท่ากับเป็นการตรวจกรอง unexpected antibodies ไปในตัว

ผู้ป่วยหรือผู้บริจาคบางรายมี autoantibodies ในซีรัมของตนเอง และหากเป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องด้วย จะเรียกว่า **cold autoantibodies** ตัวอย่างเช่น anti-I, anti-IH ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของผู้ใหญ่ทุกราย เนื่องจาก anti-I มีการพัฒนาและเพิ่มจำนวนบนผิวเม็ดเลือดแดงได้มากขึ้นเมื่อเจริญเติบโตเป็นผู้ใหญ่ และพบได้บนเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งชนิด A, B และ O และยังสามารถทำปฏิกิริยากับเซลล์ของตนเองได้ด้วยที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเมื่อเกิด unexpected reaction ใน serum grouping หรือใน screening cell อย่างกรณีดังกล่าวข้างต้น ซึ่งเกิดปฏิกิริยากับ cell B ใน serum grouping ควรพิสูจน์ว่าเป็น cold auto- หรือ cold alloantibodies

โดยนำเซลล์และซีรัมของบุคคลนั้นๆ ทำปฏิกิริยากันเอง เพื่อดูว่าเกิดการเกาะกลุ่มกันหรือไม่ หากเกิดแสดงว่าเป็น cold autoantibodies

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ตรวจสอบประวัติความเจ็บป่วย การรักษา

และประวัติการรับส่วนประกอบของเลือดเป็นอันดับแรก

2. พิสูจน์หา allo- หรือ autoantibodies โดยการนำซีรัมทำปฏิกิริยากับเซลล์ของผู้ป่วยเอง (autocontrol) และทำปฏิกิริยากับ screening cells ที่อุณหภูมิห้อง หากผลในหลอดทดสอบ autocontrol เป็นบวกแสดงว่าในซีรัมมี cold autoantibodies ดังสรุปในตาราง

Interpretation of testing results			
	screening cells	Autologous cells	conclusion
Patient serum	Positive	Negative	Cold alloantibody
Patient serum	Positive	Positive	Cold autoantibody

3. หากผลการตรวจ autocontrol เป็นบวก ให้ทดสอบชนิดของแอนติบอดีด้วยเทคนิค minicold panel หรือ remove antibody จากผิวเซลล์ด้วยวิธี prewarming technique เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทดสอบหาความจำเพาะหรือหาชนิดต่อไป

4. หากผลการตรวจสอบกับ screening cells เป็นบวก แสดงว่ามี alloantibodies ให้ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดของแอนติบอดีต่อไปด้วยการทำ antibody identification

กรณีศึกษาที่ 3 การพบ Rouleaux

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
4 ⁺	4 ⁺	2 ⁺	2 ⁺

หมายเหตุ RBCs: Red blood cell

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. ผลการตรวจ cell grouping พบปฏิกิริยาแรงตามที่ควรเป็นและบ่งบอกที่น่าจะเป็นหมู่เลือด AB
2. แต่ผลการตรวจ serum grouping ให้ปฏิกิริยาหมู่เลือดที่น่าจะเป็น O

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

หากพบลักษณะดังกล่าวนี้ สิ่งที่ต้องนึกถึงคือการพบ unexpected allo- หรือ autoantibodies หรืออีกสาเหตุหนึ่งคือการเกิด Rouleaux ซึ่งเป็นไปได้มากที่สุดเพราะปฏิกิริยาเกิดได้กับเซลล์ทั้งสองชนิดในขนาด

ความแรงเท่าๆ กัน เพราะหากเป็น allo- หรือ autoantibodies ไม่น่าจะเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกัน หรือความแรงเท่ากัน อาจพบได้แต่มีโอกาสน้อยมาก

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

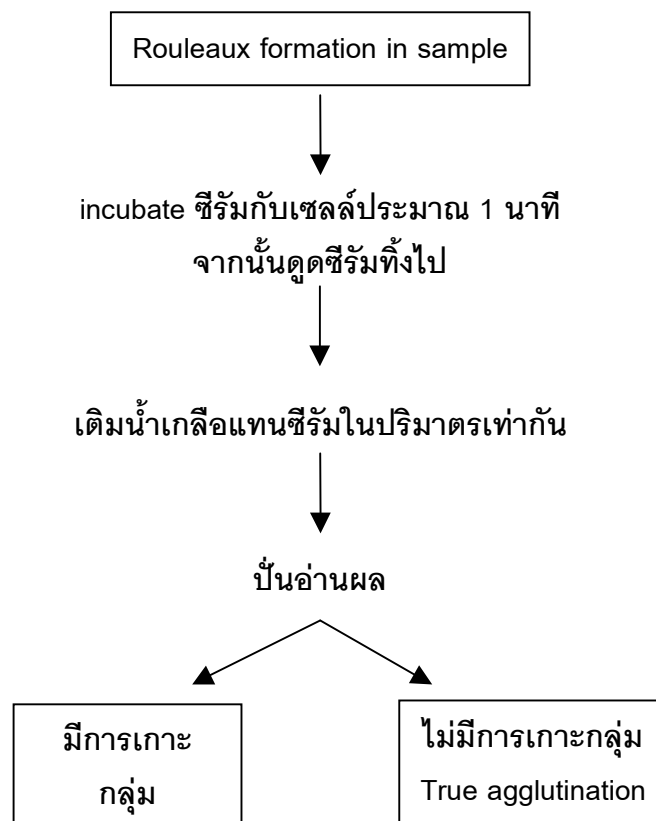
พยาธิสภาพบางอย่างทำให้มีปริมาณโปรตีนในพลาสมาหรือซีรัมสูงผิดปกติ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกันอย่างไม่จำเพาะ หากนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบการเรียงตัวของเม็ดเลือดแดงคล้ายเหรียญเรียงกันเป็นแนว พยาธิสภาพที่ทำให้เกิดภาวะดังกล่าวได้แก่ multiple myeloma และ Waldenström's macroglobulinemia

โดยปกติการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยจะไม่มีลิ่มเม็ดเลือดแดง ซึ่งไม่ค่อยประสบปัญหานี้เพราะถือเป็นคนปกติไม่มีพยาธิสภาพ

แต่ในการตรวจหมู่เลือดของผู้ป่วย จำเป็นที่จะต้องล้างเม็ดเลือดแดงอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อเป็นการกำจัดพลาสมาโปรตีนต่างๆ ที่ปะปนมา และอาจมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ทำให้อ่านผลผิดพลาดได้ เช่นเดียวกับในกรณีนี้

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ตรวจสอบประวัติความเจ็บป่วย การรักษา และประวัติการรับส่วนประกอบของเลือดเป็นอันดับแรก
2. เมื่อพบผลบวกในหลอดทดสอบและรู้สึกผิดปกติ ให้ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากพบการเกาะกลุ่มแบบเหรียญเรียงกันเป็นแนว ให้นึกถึงเรื่อง Rouleaux จากนั้นให้ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง แล้วทดสอบใหม่ ถ้าเป็นเรื่องของ Rouleaux ความผิดปกติดังกล่าวจะหายไป
3. หรือทดสอบด้วยเทคนิค Saline replacement ดังแสดงในภาพที่ 1



รูปที่ 1 Saline replacement technique

ABO discrepancies ที่เกิดใน serum grouping หรือ reverse grouping**Missing or weak antibodies**

เป็นอีกลักษณะหนึ่งที่พบได้ในการตรวจ serum

grouping มีสาเหตุจากการที่ไม่มีแอนติบอดี หรือมีแต่น้อยมากจนไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาให้เห็นด้วยตาเปล่า

กรณีศึกษา

ABO typing results			
Patient RBCs with		Patient serum with reagent RBCs	
Anti-A*	Anti-B	A	B
neg	neg	neg	neg

หมายเหตุ RBCs: Red blood cell

* monoclonal ABO antibodies

การประเมินผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

1. ผลการตรวจ cell grouping เข้าได้กับหมู่เลือด O

2. ผลการตรวจ serum grouping เข้าได้กับหมู่เลือด AB เพราะปฏิกิริยาเป็นลบกับเซลล์ทั้งสองชนิดที่ใช้ทดสอบ ซึ่งไม่สอดคล้องกับลักษณะของซีรัมของหมู่เลือด O ที่ต้องมีทั้ง anti-A, anti-B และ anti-A,B

การสรุปผลการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO

ความผิดปกติน่าจะเกิดในส่วนของการ serum grouping กล่าวคือไม่มีแอนติบอดีในซีรัม จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับเซลล์ที่ใช้ทดสอบทั้งสองชนิด

ข้อมูลสำหรับการอธิบาย

การไม่พบแอนติบอดีในซีรัมตามที่ควรเป็นตามทฤษฎีของหมู่เลือดระบบ ABO มีสาเหตุหรือคำอธิบายได้หลายกรณี ได้แก่ อายุ พยาธิสภาพ ระดับหรือปริมาณ plasma immunoglobulin ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยได้มากในการอธิบายผล เช่น ตัวอย่างเลือดของทารกแรกเกิด หรือในผู้สูงอายุ แนะนำว่าแอนติบอดีในระบบ ABO จะมีน้อยเพราะยังไม่ได้สร้างหรือสร้างได้น้อยในทารกแรกเกิด

หรือลดระดับลงเมื่อสูงวัยเพราะอวัยวะและเซลล์ที่เกี่ยวข้องเริ่มเสื่อมถอยหน้าที่ นอกจากนี้อาจเกิดจากพยาธิสภาพบางอย่างที่มีผลทำให้ระดับแอนติบอดีต่ำลงหรือไม่มีเลย เช่น Chronic lymphocytic leukemia, Congenital hypogammaglobulinemia, Acquired congenital hypogammaglobulinemia, Congenital agammaglobulinemia, Acquired congenital agammaglobulinemia, Immunosuppressive therapy, Bone marrow transplant, Multiple myeloma ดังนั้นในกรณีที่สงสัยพยาธิสภาพ หรืออายุ ที่อาจเกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับผลการตรวจหมู่เลือดที่ไม่สอดคล้องกัน จึงควรตรวจวัดระดับ immunoglobulin ในซีรัม รวมถึงการศึกษาชนิดและปริมาณของ immunoglobulin ต่างๆ ร่วมด้วย โดยเทคนิค electrophoresis ซึ่งจะช่วยให้ได้มาก

การแก้ปัญหาและการตรวจสอบเพื่อยืนยัน

1. ตรวจสอบประวัติความเจ็บป่วย การรักษา และประวัติการรับส่วนประกอบของเลือดเป็นอันดับแรก จากนั้นตรวจวัดระดับและชนิดของ serum immunoglobulin

2. หากทุกอย่างปกติ ให้ทำการตรวจซ้ำใหม่

โดยเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์และซีรัมเป็น 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นอ่านผล

3. หากผลยังเป็นลบอยู่ ให้เปลี่ยนอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาเป็นที่ 4 °C นาน 5 นาที โดยทำ

autologous control ร่วมด้วย เพื่อ rule out ปัญหา cold autoantibody

4. การอ่านผลแสดงในตาราง

Interpretation of testing results				
4 °C นาน 5 นาที	A cells	B cells	Autologous cells	Conclusion
Patient serum	Positive	Positive	Negative	Group O
Patient serum	Positive	Positive	Positive	Cold autoantibody

บรรณานุกรม

Howard PR. ABO and H blood group system and secretor status. In: Blaney KD and Howard

PR (Eds.). Basic & Applied Concepts of Immunohematology, 2000. Mosby Inc, St. Louis, Missouri.