นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจแอนติเจน D ของหมู่เลือดระบบ Rh ด้วยวิธีไมโครเพลท

พัฒน์ศิริ อังกสิทธิ์[1] สมเชษฐ์ เดชะพันธ์[1] ยศธร จงศิริกุล[1] ปราโมทย์ ศรีวาณิชรักษ์[1] มานิดา เศรษฐการ[2] สิณีนาฏ อุทา[2] และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง[1]

[1]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ [2]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ : *การตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ต้องใช้น้ำยา anti-D ชนิดเข้มข้น ทำให้ต้นทุนสูงและไม่เหมาะสมกับการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก การศึกษานี้เพื่อประยุกต์ใช้วิธีการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท ซึ่งได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจแล้วทดสอบกับตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 12,921 ราย ซึ่งได้ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1% ถึง 3% ในน้ำยา low ionic strength (LISS) โดยใช้ stick method ทดสอบกับน้ำยา anti-D ที่เจือจาง 1:50 หากได้ผลลบด้วยตาเปล่า จะทำการตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยัน weak D ด้วยวิธีหลอดทดลอง จากผลการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทและอ่านผลด้วยตาเปล่าพบว่า ให้ผลบวก (Rh positive) 12,835 ราย (ร้อยละ 99.3) และให้ผลลบ 86 ราย (ร้อยละ 0.7) ซึ่งผลการตรวจเพิ่มเติมด้วย indirect antiglobulin test พบว่า เป็น Rh negative 84 ราย (ร้อยละ 0.65) และเป็น weak D 2 ราย (ร้อยละ 0.05) โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท ซึ่งให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน อีกทั้งสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายได้ถึง 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลอง และลดเวลาการทดสอบในกรณีที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากพร้อมกัน*

Key Words : ● *แอนติเจน D* ● *วิธีไมโครเพลท*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554;21:15-21.

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1900 Landsteiner ได้ค้นพบหมู่เลือดระบบ ABO ซึ่งเป็นระบบหมู่เลือดที่มีความสำคัญมากที่สุดเพราะหากผู้ป่วยได้รับเลือดผิดหมู่จะทำให้เม็ดเลือดแดงที่เข้าไปในร่างกายทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ผู้ป่วยมีอยู่และปฏิกิริยานี้เป็นอันตรายต่อชีวิตได้[1] ต่อมาในปี ค.ศ. 1939-1941 ได้มีการค้นพบหมู่เลือดอีกระบบหนึ่ง คือ ระบบ Rh โดยนักวิจัยหลายกลุ่ม ได้แก่ Levine และ Stetson, Landsteiner และ Weiner, Levine และคณะ[2] ซึ่งมีความสำคัญรองมาจากหมู่เลือดระบบ ABO โดยหมู่เลือดระบบ Rh นั้น มี antigenic determinant ที่สำคัญคือ D, C, E, c และ e ซึ่งแอนติเจน "D" มี high antigenicity มากที่สุด ซึ่งพบว่ากรณีให้เลือด Rh positive ที่มีแอนติเจน D กับอาสาสมัคร Rh negative ซึ่งไม่มีแอนติเจน D จะมีการกระตุ้นให้สร้าง anti-D ได้ร้อยละ 80 ถึง 90 แต่สำหรับผู้ป่วย Rh negative ที่ได้รับส่วนประกอบโลหิตที่เป็น Rh positive นั้นจะมีการสร้าง anti-D ได้ร้อยละ 32 ส่วนแอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Rh ที่มีความแรงรองลงมา คือ c และ E ตามลำดับ[1,2]

หมู่เลือดระบบ Rh แบ่งเป็น Rh positive และ Rh negative โดยผู้ที่มีหมู่เลือด Rh positive หมายถึง มีแอนติเจน D อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง และหมู่เลือด Rh negative หมายถึง ไม่มีแอนติเจน D อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดง ในคนไทยพบผู้ที่มีหมู่เลือด Rh positive ได้ประมาณร้อยละ 99.7 และหมู่เลือด Rh negative พบได้เพียงร้อยละ 0.3 หรือ 3 ใน 1,000 คน แต่ในคนผิวขาวจะพบหมู่เลือด Rh negative ได้สูงถึงร้อยละ 15[1, 2] ความสำคัญทางคลินิกของหมู่เลือดระบบ Rh นั้น คือ ทำให้เกิดปัญหา hemolytic disease of the newborn (HDN), hemolytic transfusion reactions (HTR) และ autoimmune hemolytic anemia (AIHA) ดังนั้นห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาลทุกระดับจำเป็นที่จะต้องตรวจแอนติเจน D ของหมู่เลือดระบบ Rh ให้กับผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย เพื่อป้องกันการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีในกรณีที่ผู้ป่วยมีหมู่เลือด Rh negative ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาในการหาเลือดที่เข้ากันได้ในการให้เลือดครั้งต่อไป

โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการสามารถตรวจหาแอนติเจน D ได้ 2

ได้รับต้นฉบับ 25 มกราคม 2554 ให้ลงตีพิมพ์ 3 กุมภาพันธ์ 2554

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พลตรีหญิง รศ. ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121 โทรศัพท์ : 0-2986-9213 ต่อ 7251 โทรสาร: 0-2516-5379 E-mail: oytipntl@hotmail.com

วิธี คือ วิธีสไลด์ (slide test) และวิธีหลอดทดลอง (tube test) ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีมาตรฐาน คือ วิธีหลอดทดลอง แต่วิธีนี้ต้องใช้น้ำยา anti-D ชนิดเข้มข้นและมีราคาแพงหากต้องใช้น้ำยาที่นำเข้าจากบริษัทต่างประเทศ อีกทั้งต้องใช้หลอดทดลองในการทดสอบและทำให้ไม่สะดวกต่อการตรวจกรณีที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก (mass screening) จากรายงานของต่างประเทศได้มีการพัฒนาการตรวจหมู่เลือดระบบต่างๆ ด้วยวิธีอื่นเพื่อลดปัญหาดังกล่าว เช่น การตรวจด้วยวิธีไมโครเพลท[1,3,4] การตรวจด้วยวิธีเจล[1,5] เป็นต้น พบว่า วิธีเหล่านี้มีความไวสูงและสะดวกต่อการตรวจกับตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก การตรวจหมู่เลือดด้วยวิธีไมโครเพลท จะช่วยลดต้นทุนของการตรวจ เนื่องจากสามารถเจือจางน้ำยาแอนติซีรั่มได้และผลการตรวจมีความถูกต้องสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน[1,3,4]

การตรวจหาแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีไมโครเพลทนั้น ในประเทศไทยได้มีการพัฒนารูปแบบในการตรวจอย่างต่อเนื่อง เช่น งานวิจัยของอมรรัตน์ ร่มพฤกษ์ และคณะ[6] ได้ทำการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท (รูปตัววี) โดยเติม 1% papain 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใช้ไม้เขี่ยเลือดจุ่มเลือดที่ต้องการตรวจลงไปในแต่ละหลุมให้มีความเข้มข้นประมาณ 1% แล้วเติม anti-D เจือจาง 1:200 วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ส่วนงานวิจัยของมาลินี มีแสง[7] ที่ได้ทำการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท (รูปตัววี) โดยเตรียมเม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำเกลือปกติด้วยวิธี stick method ทำปฏิกิริยากับ anti-D ที่เจือจางในน้ำเกลือปกติ (1:200) แล้วอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า หลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ทั้งสองรายงาน พบว่า anti-D ที่เจือจางแล้วเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ° ซ สามารถนำมาใช้ทดสอบได้นานถึง 6 เดือน แต่เนื่องจากไม่สามารถอ่านผลการตรวจได้ทันที ทำให้มีรายงานวิจัยต่อมาของวาสนา บัวทอง และ ทนงศักดิ์ ยีละ[8] ซึ่งได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทร่วมกับการใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งวิธีที่ใช้ไมโครเพลทแบบธรรมดา (manual method) นั้นใช้ anti-D ที่เจือจางในน้ำเกลือเช่นเดียวกัน แต่จะตั้งไมโครเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่าซึ่งช่วยลดเวลาในการตรวจ ทำให้สะดวกในกรณีที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตาม การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของหมู่เลือดระบบต่างๆ ที่ต้องทำการทดสอบที่ antiglobulin phase นั้น ได้มีการนำน้ำยาอัลบูมิน หรือ น้ำยา low ionic strength solution (LISS) มาใช้ในการทดสอบเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาและลดเวลาในการ incubate[1] แต่มีข้อเสีย คือ ต้องจัดซื้อจากบริษัทต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประยุกต์วิธีการตรวจหาแอนติเจน D บนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตคนไทยโดยใช้วิธีไมโครเพลท เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม อ่านผลง่าย ถูกต้อง ใช้เวลาน้อยและประหยัดงบประมาณ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างเลือด (clotted blood) ของผู้บริจาคโลหิตที่เหลือจากการทดสอบประจำที่ห้องปฏิบัติการหน่วยคัดกรองจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 12,921 ราย ตั้งแต่ 31 มีนาคม 2553 ถึง 13 พฤษภาคม 2553

น้ำยาและเซลล์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

- Anti-D ชนิด IgM/IgG (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 52012)
- น้ำยา LISS pH 6.7 เตรียมโดยละลาย sodium chloride 1.75 กรัม (ก.) และ glycine 18 ก. ใน phosphate buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (มล.) แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.7± 0.1 ด้วย NaOH แล้วเติม sodium azide 0.5 ก. ลงไปเพื่อเป็น preservative[1]
- Rh positive control cells: screening cells (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 53030 และ Lot. 53040)
- Rh negative control cells: Panel cells (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 53030 และ Lot. 53040)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ

- เครื่องปั่นสำหรับไมโครเพลท (Eppendorf centrifuge รุ่น 5810R, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงทางธนาคารเลือด (DiaCent-12, DiaMed, Switzerland)
- เครื่องเขย่าไมโครเพลท (Titer plate shaker, Germany)
- ไมโครเพลท รูปตัวยูขนาด 96 หลุม

วิธีการ

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจแอนติเจน D เพื่อแยกชนิดของ Rh positive และ Rh negative ขั้นตอนที่ 2 ผู้วิจัยสามคนทำการตรวจแอนติเจน D ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีไมโครเพลท

1. การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจแอนติเจน D เพื่อแยกชนิดของ Rh positive และ Rh negative

1.1 เปรียบเทียบการตรวจแอนติเจน D โดยการเจือจางน้ำยา

anti-D

เจือจางเม็ดเลือดแดงของ Rh positive (screening cells ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) และ Rh negative (panel cells ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) ให้ได้ความเข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS แล้วเจือจางน้ำยา anti-D (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) ด้วยน้ำเกลือให้ได้ ความเจือจาง 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100, 1:160 และ 1:320 ตามลำดับ หยด anti-D ที่เจือจางลงในไมโครเพลท หลุมละ 25 ไมโครลิตร แล้วหยดเม็ดเลือดแดงของ Rh positive และ Rh negative ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 1% ในน้ำยา LISS ลงไปในแต่ละหลุมให้ตรงกับที่เขียนกำกับไว้ แล้วเขย่าส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงและ anti-D ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Titer plate shaker, Germany) ที่มีความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับไมโครเพลทความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที หลังจากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เคาะที่มุมเพลทเบาๆ อ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

1.2 การหาระยะเวลาในการ incubate เซลล์และ anti-D ก่อนการปั่นอ่าน

เจือจางเม็ดเลือดแดงของ Rh positive และ Rh negative ด้วยน้ำยา LISS ให้ได้ความเข้มข้น 1% แล้วเจือจาง anti-D ด้วยน้ำเกลือให้ได้ความเจือจาง 1:50 หยด anti-D ที่เจือจางแล้วลงในไมโครเพลท หลุมละ 25 ไมโครลิตร (มคล.) แล้วหยดเม็ดเลือดแดงของ Rh positive และ Rh negative ที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS ลงไปในแต่ละหลุมให้ตรงกับที่เขียนกำกับไว้ โดยเตรียมเป็น 3 ชุด เขย่าส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงและ anti-D ให้เข้ากัน ด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ชุดที่ 1 นำไปปั่นอ่านทันที ชุดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ส่วนชุดที่ 3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับไมโครเพลท ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เคาะที่มุมเพลทเบาๆ อ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในแต่ละชุด

1.3 การหาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจน D

เจือจางเม็ดเลือดแดงของ Rh positive และ Rh negative ด้วยน้ำยา LISS ให้ได้ความเข้มข้น 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ตามลำดับ แล้วเจือจาง anti-D ด้วยน้ำเกลือให้ได้ความเจือจาง 1:50 หยด anti-D ที่เจือจางแล้วลงในไมโครเพลท หลุมละ 25 มคล. แล้วหยดเม็ดเลือดแดงของ Rh positive และ Rh negative ที่มีความเข้มข้น 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ในน้ำยา LISS ลงไปในแต่ละหลุมให้ตรงกับที่เขียนกำกับไว้ เขย่าส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงและ anti-D ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับไมโครเพลท ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 40 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เคาะที่มุมเพลทเบาๆ อ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

2. การดำเนินการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท

ผู้วิจัยสามคนทำการตรวจแอนติเจน D ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีไมโครเพลท โดยที่ไม่ทราบผลการทดสอบจากการตรวจประจำมาก่อน (blind test) เมื่อทำการทดสอบเสร็จแล้ว นำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลจากห้องปฏิบัติการหน่วยคัดกรองจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย วิธีการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท ทำโดยเขียนกำกับหมายเลข 1 ถึง 94 ลงบนไมโครเพลท โดยกำหนดให้ 2 หลุมสุดท้ายเป็น positive control (Rh positive, D+) และ negative control (Rh negative, D-) เติมเซลล์ positive control (PC) และ negative control (NC) ที่มีความเข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS ปริมาตร 25 มคล. ลงในหลุมที่เขียนกำกับไว้ สำหรับตัวอย่างตรวจเติมน้ำยา LISS ปริมาตร 25 มคล. ลงในหลุมที่ 1 ถึง 94 ใช้ไม้เขี่ยเลือดจุ่มเลือดที่ต้องการตรวจลงในหลุมที่เขียนกำกับไว้ (ความเข้มข้นประมาณ 1% ถึง 3%) แล้วเติม anti-D ที่เจือจาง (1:50) ลงในไมโครเพลท หลุมละ 25 มคล. ทั้ง 96 หลุม เขย่าเพลทด้วยเครื่องเขย่า 40 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลท ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 1 นาที หลังจากนั้นเขย่าเพลท นาน 2 นาที เคาะที่มุมเพลทเบาๆ อ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การอ่านผลการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท ด้วยตาเปล่า ถ้าให้ผลบวก จะเห็นเซลล์มีลักษณะเป็นก้อนเม็ดกระดุม น้ำใส โดยอ่านปฏิกิริยาตามความแรงดังนี้ 4+ คือ เม็ดเลือดแดงเป็นก้อนเดียว น้ำใส 3+ คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็น 2-3 ก้อน น้ำใส 2+ คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นหลายก้อน น้ำขุ่น 1+ คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็ก น้ำขุ่น สำหรับผลลบ (0) จะเห็นเซลล์มีลักษณะแผ่คลุมผิวหลุม น้ำขุ่น ในกรณีที่ให้ผลลบด้วยตาเปล่า คือ ไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะต้องนำมาตรวจยืนยันว่าเป็น Rh negative หรือ weak D ด้วยวิธี indirect antiglobulin test (IAT) โดยใช้วิธีหลอดทดลอง[1] แล้วนำ

ผลการตรวจมายืนยันกับผลการตรวจที่ได้จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

3. การศึกษาความคงตัวของ anti-D ที่เจือจางในน้ำเกลือ

ได้ทำการศึกษาหาความคงตัวของ anti-D ที่เจือจางในน้ำเกลือ โดยทำการเจือจาง anti-D ในน้ำเกลือ (1:50) แบ่งเก็บไว้ที่ -20°ซ และนำมาทดสอบคุณภาพด้วยการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Rh positive และ Rh negative ด้วยวิธีไมโครเพลท และทำการศึกษานี้เดือนละครั้ง จนครบ 4 เดือน

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจแอนติเจน D เพื่อแยกชนิดของ Rh positive และ Rh negative โดยการเจือจาง anti-D ด้วยน้ำเกลือและทดสอบกับเม็ดเลือดแดงที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 1% ในน้ำยา LISS พบว่า ปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เป็น Rh positive ให้ผลปฏิกิริยาเป็น 4+ ตั้งแต่ไม่เจือจาง จนถึงความเจือจางที่ 1:100 และ ผลของปฏิกิริยาลดลงเป็น 2+ ที่ความเจือจาง 1:160 และ 1:320 สำหรับการทดสอบกับ Rh negative นั้นให้ผลลบเหมือนกันในทุก dilution คือ เม็ดเลือดแดงไม่มีการจับกลุ่ม น้ำขุ่น ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ anti-D ที่ความเจือจาง 1:50 สำหรับการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทนั้นได้แบ่ง anti-D ที่เจือจางแล้วใส่ในหลอด หลอดละ 12 มล. แบ่งเก็บไว้ที่ -20°ซ เมื่อต้องการทดสอบนำมาละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนการใช้งาน

จากการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการ incubate เซลล์กับน้ำยา anti-D สำหรับการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยใช้ anti-D ที่ความเจือจางเท่ากับ 1:50 และเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาที่ปั่นอ่านผลทันที ที่ incubate ก่อนการปั่นนาน 5 นาที และ 10 นาที พบว่า ปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงให้ผลเป็น 4+ (เป็นเม็ดกระดุม น้ำใส) เหมือนกันทุกช่วงเวลา แต่กรณีที่ปั่นอ่านผลทันทีและ incubate ไว้นาน 5 นาที พบว่าลักษณะของการจับกลุ่มขอบไม่เรียบ ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้ สำหรับการทดสอบกับ Rh negative นั้นให้ผลลบเหมือนกันทุกช่วงเวลา คือ เม็ดเลือดแดงไม่มีการจับกลุ่ม น้ำขุ่น ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นการศึกษานี้ จึงเลือกใช้การ incubate ส่วนผสมนาน 10 นาทีก่อนการปั่นอ่านผล

การหาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทที่ความเข้มข้น เท่ากับ 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ในน้ำยา LISS โดยเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับ anti-D ที่ความเจือจางเท่ากับ 1:50 หลังจาก incubate ส่วนผสมนาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นอ่านผลพบว่า กรณีที่ใช้เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 1% ถึง 3% หลังจากเคาะเพลทแล้วเม็ดเลือดแดงสามารถหลุดออกมาได้ง่ายกว่าการใช้เม็ดเลือดแดงที่ความเข้มข้น 4% และ 5% สำหรับการทดสอบกับ Rh negative นั้นให้ผลลบเหมือนกันทั้งหมด คือ เม็ดเลือดแดงไม่มีการจับกลุ่ม น้ำขุ่น ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นการศึกษานี้ จึงเลือกใช้เม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้น 1% ถึง

Table 1 Comparison of different dilutions of anti-D tested with Rh positive and Rh negative red cells using microplate technique

Type	Undiluted	1:10	1:20	1:40	1:50	1:80	1:100	1:160	1:320
Rh positive	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	2+
Rh negative	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Determination of an optimum incubation time for red blood cells and anti-D (1:50) before centrifugation

Type	0 นาที	5 นาที	10 นาที
Rh positive	4+*	4+*	4+
Rh negative	0	0	0

หมายเหตุ * เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนเดียวน้ำใส แต่ขอบไม่เรียบ

Table 3 Determination of an optimum red blood cell concentration for D antigen typing

Type	Red cell suspension in LISS				
	1%	2%	3%	4%	5%
Rh positive	4+	4+	4+	3+	3+
Rh negative	0	0	0	0	0

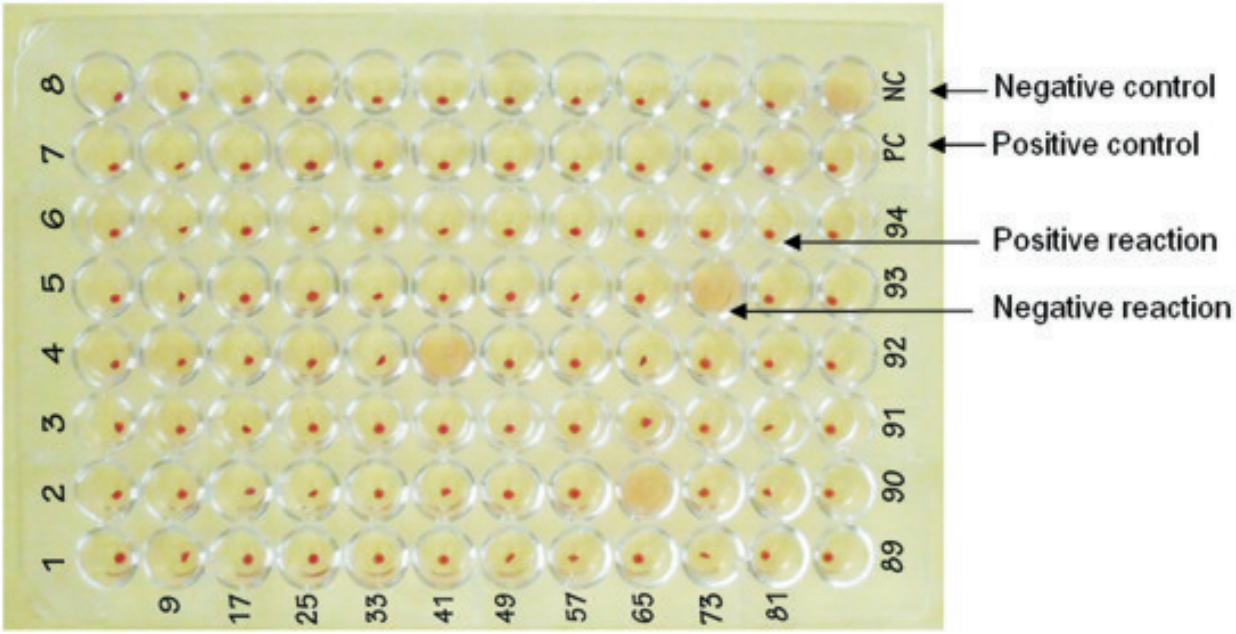

Figure 1 Detection of Rh (D) antigen typing using microplate technique (negative reactions: no.44, no.66 and no.77)

3% ในน้ำยา LISS

การตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทกับตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 12,921 รายนั้น ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงในน้ำยา LISS โดยใช้ stick method ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1% ถึง 3% แล้วทดสอบกับน้ำยา anti-D ที่เจือจาง 1:50 หลังจากนั้น incubate ส่วนผสมนาน 10 นาที นำไปปั่นอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า เป็น Rh positive จำนวน 12,835 ราย (ร้อยละ 99.3) และรายที่ให้ผลลบ จำนวน 86 ราย (ร้อยละ 0.7) ตัวอย่างผลการตรวจดังรูปที่ 1 เมื่อนำตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบมาทำการทดสอบยืนยันว่าเป็น Rh negative หรือ weak D ด้วยวิธีหลอดทดลอง พบว่า เป็น Rh negative จำนวน 84 ราย (ร้อยละ 97.7) และเป็น weak D จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 2.3)

นอกจากนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของ anti-D ที่เจือจางในน้ำเกลือ โดยแบ่งเก็บน้ำยา anti-D ที่เจือจางแล้วนำไปแช่แข็งที่ -20° ซ และนำมาทดสอบทุกเดือนโดยนำน้ำยา ant-D ที่แบ่งเก็บไว้มาทดสอบคุณภาพกับเซลล์มาตรฐาน (Rh positive และ Rh negative controls) ตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจในตัวอย่างทดสอบ โดยทำการทดสอบเดือนละครั้ง เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ผลการทดสอบแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทให้ผลถูกต้องทั้งเซลล์ของ Rh positive และ Rh negative ทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ

วิจารณ์

การตรวจหาแอนติเจนของหมู่เลือดระบบต่างๆ เช่น ABO, Rh ด้วยวิธีไมโครเพลทนั้น ได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดที่มีตัวอย่างตรวจจำนวนมากพร้อมกัน ซึ่งอาจตรวจด้วยวิธี manual หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ พบว่า ให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน[1,4,6-8] การตรวจแอนติเจน D ของหมู่เลือดระบบ Rh ด้วยวิธีไมโครเพลทส่วนใหญ่จะเจือจาง anti-D เพื่อลดต้นทุนค่าใช้จ่าย ซึ่งพบว่า สามารถเจือจาง anti-D ได้ตั้งแต่ 1: 50 ถึง 1:200 ขึ้นอยู่กับชนิดของ anti-D สำหรับการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ใช้น้ำยา anti-D ชนิด IgM/IgG ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้ง weak D และ partial D antigen โดยเฉพาะอย่างยิ่ง D VI ได้เมื่อทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี IAT โดยได้นำ anti-D มาเจือจางที่ 1: 50 พบว่า ผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการหน่วยคัดกรองจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบหาความคงตัวของ anti-D ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า คุณภาพของน้ำยา anti-D ที่เจือจางและแบ่งเก็บไว้นั้น เมื่อนำมาใช้ในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทไม่มีความแตกต่างกัน ตลอดระยะเวลา 4 เดือน สำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการนำวิธีนี้ไปใช้ จะต้องทดสอบหาความแรงที่เหมาะสมของ anti-D ก่อนการนำไปใช้ทุกครั้ง เนื่องจากความแตกต่างของน้ำยาแต่ละบริษัท

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท ส่วนใหญ่ ใช้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงประมาณ 1%[6-8] แต่ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้เม็ดเลือดแดงเจือจาง 1% ถึง 3% ในน้ำยา LISS พบว่า ให้ผลการตรวจถูกต้องชัดเจน ทั้ง Rh positive และ Rh negative การใช้น้ำยา

LISS เป็นตัวเจือจางเม็ดเลือดแดงจะช่วยลดประจุลบบนผิวเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้น นอกจากนี้อาจใช้อัลบูมินหรือเอนไซม์ papain ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา[1,9] แต่ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการเตรียมน้ำยาจะสูงกว่าการใช้น้ำเกลือหรือน้ำยา LISS ที่เตรียมขึ้นใช้เอง ดังนั้นการทดสอบครั้งนี้ได้คำนวณต้นทุนค่าน้ำยาทั้งหมด พบว่า การตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทจำนวน 1 เพลท โดยใช้น้ำยา anti-D และน้ำยา LISS สามารถทำการทดสอบได้ 94 รายพร้อมกันและสรุปผลการทดสอบได้ภายในเวลา 30 นาที จะมีต้นทุนประมาณ 1 บาทต่อราย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีหลอดทดลองโดยใช้น้ำยา anti-D ชนิดเดียวกัน จะมีต้นทุนประมาณ 2.50 บาทต่อราย สำหรับห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณการตรวจไม่มากต่อครั้ง สามารถแบ่งไมโครเพลท ตรวจได้หลายครั้งขึ้นกับจำนวนการทดสอบแต่จะต้องมีการควบคุมคุณภาพโดยมี positive และ negative controls ควบคู่ด้วยทุกครั้ง และ anti-D ที่เจือจางแล้วควรแบ่งเก็บในปริมาตรที่เหมาะสมกับการทดสอบแต่ละครั้ง

การตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทสามารถอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง[6,7] แต่การนำไปปั่นอ่านผลจะช่วยลดเวลาในการทดสอบ[8] ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงนำไมโครเพลทไปปั่นเพื่อลดเวลาในการ incubate พบว่า ปฏิกิริยาของ Rh positive และ Rh negative ด้วยตาเปล่าให้ผลถูกต้องสอดคล้องกันทุกราย นอกจากนี้การตรวจแอนติเจน D ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 12,921 ราย พบว่า เป็น Rh positive (ร้อยละ 99.3), Rh negative (ร้อยละ 0.68) และ weak D (ร้อยละ 0.02) ซึ่งการกระจายของ Rh negative ค่อนข้างสูงกว่าที่มีรายงานไว้ในคนไทย[10, 11] ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาอาจมีการตามผู้บริจาคโลหิตที่เป็น Rh negative มาบริจาคโลหิตให้กับกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น Rh negative

ถึงแม้ว่าการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท จะให้ผลการตรวจที่แยกระหว่างผลบวกกับผลลบได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า แต่ยังมีข้อจำกัดในกรณีที่ได้ผลลบจะไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น Rh negative หรือ weak D งานวิจัยนี้เป็นการตรวจแอนติเจน D ของผู้บริจาคโลหิตจะต้องนำตัวอย่างที่ให้ผลลบมาตรวจยืนยันเพิ่มเติมทุกครั้ง ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีผลลบด้วยตาเปล่าจำนวน 86 ราย เมื่อนำมาตรวจยืนยันด้วยวิธี indirect antiglobulin test โดยใช้วิธีหลอดทดลอง ให้ผลเป็น Rh negative (ร้อยละ 97.7) และเป็น weak D (ร้อยละ 2.3) แต่ได้มีรายงานของต่างประเทศที่พัฒนาการตรวจ weak D ด้วยระบบ solid-phase red cell adherence โดยใช้เครื่องอัตโนมัติและพบว่าให้ผลถูกต้องตรงกับการตรวจด้วยวิธีหลอดทดลอง[12,13]

โดยสรุปจากการศึกษาวิธีการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท โดยเจือจางเม็ดเลือดแดงในน้ำยา LISS ทดสอบกับน้ำยา anti-D ที่เจือจาง (1:50) นำไปปั่นอ่านผลด้วยตาเปล่า หลังจาก incubate ส่วนผสมนาน 10 นาที และต้องมีการควบคุมคุณภาพโดยการใช้ positive และ negative controls ควบคู่ไปกับทุกการทดสอบ พบว่า วิธีนี้ให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับผลการทดสอบของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย อีกทั้งช่วยลดต้นทุนได้ถึง 2.5 เท่า และสะดวกในกรณีตัวอย่างทดสอบจำนวนมากพร้อมกัน โดยห้องปฏิบัติการที่จะนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้ควรมีอุปกรณ์ที่จำเป็น เช่น เครื่องปั่นไมโครเพลท เครื่องเขย่าเพลท ซึ่งอาจใช้ร่วมกับงานตรวจทางอิมมูนวิทยาได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่สามารถแยกระหว่าง Rh negative และ weak D ได้ ดังนั้นควรใช้น้ำยา anti-D ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเพิ่มเติมในการสรุปผล

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยทางเทคนิคการแพทย์สำหรับนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยคัดกรองจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างทดสอบและให้ข้อมูลเพื่อยืนยันผลการตรวจ รวมทั้งขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย ธรรมศาสตร์ ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องปั่นสำหรับไมโครเพลท และขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนงบประมาณและสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. *Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD. Technical Manual 16th ed. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2008:387-411.*
2. *Harmening DM. Modern Blood banking and Transfusion Practice. 5th ed. F.A. Davis Company, 2005:134-47.*
3. *Andreson HJ, Patel S. Red cell phenotyping using hexadimethrine bromide (Polybrene) in a microplate system. Transfusion 1987;24:353-6.*
4. *Dixon MR. Microplate: a flexible system for serologic testing. In: Myerds M, Reynolds A, editors. Micromethod in blood group serology. Arlington: American Association of Blood Banks, 1984:376-9.*
5. *Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, Sriphaisal T. A preliminary study of the distribution of the blood group systems in Thai blood donors determined by the gel test. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2001;32:204-7.*
6. *อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, มาลินี มีแสง. การดัดแปลงเทคนิคไมโครเพลทเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจน D. วารสาร*

เทคนิคการแพทย์. 2535;20:123-7.

7. *มาลินี มีแสง. การใช้เทคนิคไมโครเพลทตรวจหาแอนติเจนอาร์เอชดีโดยใช้แอนติ-ดีเจือจางทำปฏิกิริยาในน้ำเกลือปกติ. ศรีนครินทร์เวชสาร. 2540;12:207-11.*
8. *วาสนา บัวทอง, ทนงศักดิ์ ยีละ. เปรียบเทียบการตรวจหมู่เลือดระบบ ABO และ Rh(D) แอนติเจน ระหว่างวิธีไมโครเพลทธรรมดาที่ทำด้วยมือกับวิธีไมโครเพลทใช้เครื่องอัตโนมัติ. สงขลานครินทร์เวชสาร 2547;22:83-7.*
9. *อ้อยทิพย์ ณ ถลาง ปราโมทย์ ศรีวาณิชรักษ์. ปฏิบัติการพื้นฐานธนาคารเลือด. ชัยเจริญ, กรุงเทพฯ, 2553:59-65.*
10. *ศศิธร เพชรจันทร, อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, จริยา สายพิณ, สุกัญญา กุวานนท์, กรองทิพย์ วิจิตรจินดา, อำพร วงศ์ภัทรนนท์. การศึกษาการกระจายของหมู่เลือดระบบต่างๆ ด้วยวิธีเจลในผู้บริจาคโลหิต. สารศิริราช 2545;54:403-9.*
11. *Chandanayingyong D, Sasaki TT, Greenwalt TJ. Blood groups of the Thais. Transfusion. 1967;7:267-76.*
12. *Sinor LT, Rachel JM, Beck ML, Bayer WL, Coenen WM, Plapp FV. Solid-phase ABO grouping and Rh typing. Transfusion 1985;25:21-3.*
13. *Lai M, Mavilia G, d'Onofrio G, Leone G. Detection of weak D with a fully automated solid-phase red cell adherence system. Transfusion 2005;45:689-93.*

Detection of Rh (D) Antigen Using Microplate Technique

Patsiri Angkasit[1], Somchet Dachapan[1], Yossathorn Jongsirikul[1], Pramote Sriwanitchrak[1], Manida Setthakarn[2], Sineenart Oota[2] and Oytip Nathalang[1]

[1] *Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumtani,*

[2] *National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand*

Abstract : *Disadvantages of the standard tube technique (STT) for D antigen typing are high cost due to the use of undiluted anti-D and not suitable for mass screening. This study aimed to modify microplate technique for D antigen typing. Appropriate conditions for testing were performed. Altogether, 12,921 blood samples obtained from blood donors of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society were included. Red blood cells of each sample were diluted to 1-3% in low ionic strength solution (LISS) using stick method and tested with diluted anti-D (1:50). Weak D confirmation test by STT was performed in a case of negative reaction by naked eyes. Regarding the D antigen typing results read by naked eyes, it was found that positive reactions (Rh positive) were 12,835 cases (99.3%) and negative reactions were 86 cases (0.7%). Following confirmation test by indirect antiglobulin test, there were 84 Rh negative (0.65%) and 2 weak D cases (0.05%). In conclusion, D antigen typing was performed by modified microplate technique. All results obtained were concordance with standard technique. Additionally, the total cost of this technique is 2.5 times cheaper than STT and less time consuming for mass screening.*

Key Words : ● *D antigen* ● *Microplate technique*

J Hematol Transfus Med 2011;21:15-21.