นิพนธ์ต้นฉบับ

ความคงทนของแอนติเจนหมู่เลือดในผลิตภัณฑ์ Identification Panel Cells ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

สาริกา เมฆฉาย ภูรยา โอวาทกา ดุษฎี ภูรีกุล กัลยา เกิดแก้วงาม จินตนา ทับรอด และ อุดม ติ่งต้อย
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

ความเป็นมา *เนื่องจาก identification panel cells มีความสำคัญในการตรวจเพื่อบอกชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต คุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้เตรียมต้องตระหนักเพื่อความปลอดภัยของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีและมีความจำเป็นต้องได้รับเลือด* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อประเมินความคงทนของแอนติเจนหมู่เลือดในผลิตภัณฑ์ identification panel cells ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย* ***วัสดุและวิธีการ*** *นำผลิตภัณฑ์ identification panel cells จำนวน 3 ชุดของการผลิตได้แก่ Lot.No. 58010, 58020 และ 58030 มาทดสอบความแรงของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยเจือจางแบบ serial two-fold dilution จากนั้นทดสอบด้วยวิธี conventional tube test (CTT) และวิธี column agglutination technique (CAT) โดยใช้ ID LISS/Coombs Card และ ID NaCl, Enzyme Card ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ อ่านผลปฏิกิริยาเป็นคะแนน (score) คำนวณหาร้อยละของความแรงของแต่ละแอนติเจนที่ลดลงระหว่างวันแรกที่ผลิตเสร็จ (สัปดาห์ที่ 0) สัปดาห์ที่ 4 และเมื่อเก็บต่อถึงสัปดาห์ที่ 10* ***ผลการศึกษา*** *identification panel cells เมื่อผลิตเสร็จและถูกนำมาทดสอบความแรงของแอนติเจนทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่าเมื่อครบ 4 สัปดาห์มีความแรงของแอนติเจนลดลงจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 0-5 ได้แก่ แอนติเจน c, M, S, s, Le^a, Jk^a, Fy^a, k และ Di^b กลุ่มที่ 2 มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 6-10 ได้แก่ แอนติเจน D, C, E, e, N, Jk^b และ K กลุ่มที่ 3 มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 10-20 ได้แก่ แอนติเจน P1, Le^b และ Di^a และกลุ่มที่ 4 มีความแรงของแอนติเจนลดลงมากกว่าร้อยละ 20 ได้แก่ แอนติเจน Mi^a และ Fy^b เมื่อเก็บ identification panel cells ต่อถึงสัปดาห์ที่ 10 พบว่าแอนติเจนมีผลความแรงลดลงตามระยะเวลา และแอนติเจนที่มีความแรงลดลงมากที่สุด คือ Mi^a (ร้อยละ 52.78) รองลงมา คือ K, Di^a และ Fy^b ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 มีความแรงลดลงคิดเป็นร้อยละ 47.46, 46.00 และ 41.88 ตามลำดับ* ***สรุป*** *จากการศึกษาแสดงว่า identification panel cells ที่มีอายุมากกว่า 1 เดือน ยังคงมีความแรงของแอนติเจนสูงสามารถนำไปใช้ตรวจยืนยันชนิดของแอนติบอดีและตรวจแยกชนิดของ multiple antibodies ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง rare antigen ซึ่งหาได้ยากในคนไทย เช่น K(+) และ Fy(a-) เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับเลือดที่เหมาะสมและปลอดภัย*

คำสำคัญ : ● *Identification panel cells stability* ● *Identification panel cells reagent* ● *Antigen potency*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2560;27:379-87.

ได้รับต้นฉบับ 11 เมษายน 2560 รับลงตีพิมพ์ 15 กันยายน 2560

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาริกา เมฆฉาย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
E-mail: sarika_sa@hotmail.co.th

Original Article

Stability of Red Cell Antigens in Identification Panel Cells of National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Sarika Makechay, Phuraya Ovataga, Dussadee Pooreekul, Kallaya Kirdkaewngam, Jintana Tubrod and Udom Tingtoy

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: *Identification panel cells are used to identify alloantibodies of the patients and blood donors. The quality of panel cells are essential that the producer should be considered in order to provide appropriated blood for alloimmunized patients.* ***Objective*** *This study aims to evaluate the stability of red blood cell antigens in identification panel cells prepared by the National Blood Centre, Thai Red Cross Society.* ***Materials and Methods*** *The serial two-fold dilution of three sets of identification panel cells (Lot. No.58010, 58020, and 58030) were tested with conventional tube test (CTT) and column agglutination technique (CAT) using ID LISS/Coombs Card and ID NaCl, Enzyme Card of Bio-Rad company. The antigen potency was determined by score and calculated the percentage decrease of potency at week 0 (the first day of reagent preparation), week 4 (the expired date) and week 10.* ***Results*** *The results obtained were separated into four groups of the antigen decreasing score percentages (0-5%, 6-10%, 10-20% and > 20%, respectively). The first group, 0-5% decreasing scores were found in c, M, S, s, Le^a, Jk^a, Fy^a, k and Di^b antigens. The second group, 6-10% decreasing scores were found in D, C, E, e, N, Jk^b and K antigens. The third group, 10-20% were found in P1, Le^b, Di^a antigens and the fourth group, > 20% were found in Fy^b and Mi^a antigens. In addition, we also tested the antigen potency after 10 weeks and found that Mi^a antigen had the most decrease score (52.78%), followed by K, Di^a and Fy^b antigens (47.46%, 46.00% and 41.88%, respectively).* ***Conclusion*** *The study indicates that even after 4 weeks, the identification panel cells still have high antigen potency. These cells are suitable for confirmation and identification of mixture of antibodies especially panel cells with rare antigen such as K(+) and Fy(a-). Thus, appropriate blood could be transfused to the patients.*

Keywords : ● *Identification panel cells stability* ● *Identification panel cells reagent* ● *Antigen potency*

J Hematol Transfus Med 2017;27:379-87.

บทนำ

การตรวจกรองและการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี (antibody screening & antibody identification) ต่อแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง นับเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในการจัดหาเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย (pre-transfusion) ในการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีได้ถูกต้องชัดเจนจะต้องมีชุด identification panel cells ที่มีคุณภาพดี ซึ่งเป็นเซลล์ที่เตรียมมาจากโลหิตหมู่ "O" จำนวน 8-11 ราย เมื่อประกอบรวมกันแล้วต้องมีแอนติเจนต่อหมู่เลือดต่างๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิกครบ ได้แก่ แอนติเจน C, c, D, E, e, M, N, Mi^a, S, s, P1, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, K, k, Di^a และ Di^b แอนติเจนเหล่านี้อาจมีฟีโนไทป์เป็น homozygous หรือ heterozygous cells แต่ในระบบ Rh, Kidd Duffy และ MNS ควรเป็น homozygous cells[1] เนื่องจากแอนติบอดีต่อหมู่เลือดเหล่านี้สามารถแสดง dosage effect และมักสร้างร่วมกับแอนติบอดีอื่นๆ[2]

การผลิต identification panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ประกอบด้วยเลือดผู้บริจาค หมู่ O จำนวน 11 ราย มีอายุไม่เกิน 5 วัน ผ่านกระบวนการเตรียมและเก็บใน modified alsever's solution ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีอายุการใช้งานยาวนานกว่า 1 เดือนนับจากวันผลิต ตามที่ได้เคยทำการศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ พบว่าแอนติเจนต่อหมู่เลือดบางระบบ เช่น P1, Le^a, Le^b, Mi^a, M, N, E จะมีการเสื่อมสลายและมีความแรงลดลงประมาณร้อยละ 40 ในช่วงเวลาของการเก็บรักษาและใช้งาน identification panel cells[3] นอกจากนี้ได้มีการศึกษาความคงทนของแอนติเจนใน 0.8% reagent red blood cells ที่เก็บใน Celpresal™ LISS ของบริษัท CSL Limited Australia โดยนำ reagent red cells มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะหลายตัวอย่าง ด้วยเครื่อง BioVue™ บริษัท Ortho Clinical Diagnostics, United Kingdom และ DiaMed™ ID-MTS™ บริษัท DiaMed, Switzerland พบว่าแอนติเจนของ reagent red cells ยังคงสามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีเหล่านั้นได้ดีตลอดระยะเวลา 6 สัปดาห์[4] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบความคงทนของแอนติเจน ใน reagent red cells จากผู้ผลิต 3 รายได้แก่บริษัท Medion Grifols Diagnostics, Switzerland บริษัท Ortho Clinical Diagnostics, United Kingdom และ Immucore Gamma, U.S.A โดยการนำมาตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะที่ระยะเวลาต่างๆ ประกอบด้วย เมื่อได้รับ red cell reagent เมื่อผลิตภัณฑ์หมดอายุ และหลังจากหมดอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า reagent red cells บางบริษัทไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะบางระบบได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง anti-E และ anti-Jk^a[5] การศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากที่เคยมีเนื่องจากเป็นการประเมินความคงทนของแอนติเจนหมู่เลือดโดยตรง จึงกำหนดให้มีแอนติบอดีที่จำเพาะเพียงระบบละ 1 ตัวอย่าง โดยนำมาทดสอบความแรงกับแอนติเจนที่จำเพาะหลายตัวอย่างในผลิตภัณฑ์ identification panel cells เพื่อดูความแรงของแอนติเจนที่ลดลงในระยะเวลาต่างๆ เนื่องจากปัจจุบัน ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ มีปริมาณการผลิต reagent red cells เพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องใช้เลือดบริจาคที่มีอายุเกิน 5 วันมาผลิต ซึ่งในกระบวนการผลิตต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 10 วันรวมเป็น 15 วันซึ่ง identification panel cells มีอายุเพียง 1 เดือน เมื่อนับอายุเลือดจะพบว่าเลือดบริจาคจะมีอายุประมาณ 45 วันจนถึงวันที่หมดอายุ ดังนั้นจึงดำเนินการศึกษาความสามารถในการตรวจหาแอนติบอดีของแอนติเจนใน identification panel cells นับตั้งแต่วันที่ผลิตเสร็จจนกระทั่งถึงวันหมดอายุ และศึกษาต่อจนครบ 10 สัปดาห์ เพื่อประเมินความคงทนของแอนติเจน จากผลความแรงที่ลดลง ในช่วงเวลาต่างๆ

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. Identification panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ผลิตครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ในปี พ.ศ. 2558 (Lot No. 58010, 58020 และ 58030)
2. Antisera สำหรับทดสอบความคงทนของแอนติเจนได้แก่
   2.1 Antisera จากพลาสมาของผู้บริจาคโลหิตได้แก่ anti-P1, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-S, anti-Jk^a และ anti-Mi^a บรรจุหลอดๆ ละ 2-4 มล. จำนวน 7 ชุด เก็บที่อุณหภูมิ -20°C
   2.2 Antisera ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้แก่ anti-D, anti-E, anti-c, anti-M, anti-N เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C
   2.3 Antisera ของ บริษัท CSL Limited, Australia ได้แก่ anti-s และ anti-k
   2.4 Antisera ของ บริษัท DiaMed, Switzerland ได้แก่ anti-e และ anti-K
   2.5 Antisera ของ บริษัท Alba Bioscience, Scotland ได้แก่ anti-C, anti-Jk^b และ anti-Fy^a
   2.6 Antisera ของ Japanese Red Cross ได้แก่ anti-Fy^b, anti-Di^a และ anti-Di^b
3. Serofuge centrifuge DiaCent -12 บริษัท DiaMed, Switzerland
4. ID centrifuge 12-SII บริษัท DiaMed, Switzerland
5. ID Incubator 37 SI บริษัท DiaMed, Switzerland

6. ID-card NaCl/Enzyme บริษัท DiaMed, Switzerland

7. ID-card LISS/Coombs บริษัท DiaMed, Switzerland

8. ID Diluent 1 (Modified Bromelin solution for red cell suspensions and enzyme tests)

9. ID Diluent 2 (Modified LISS for red cell suspensions)

10. หลอดทดลองขนาด 12x75 มม. และ 10x75 มม.

11. Antihuman globulin (AHG) reagent ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ Lot. 57023

12. 1% Bovine Serum Albumin(1% BSA)

13. 0.9% Normal Saline Solution (0.9% NSS)

14. Alsever's solution ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ Lot. 57120

วิธีการ

การทดสอบความคงทน (stability) ของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในผลิตภัณฑ์ identification panel cells ทำการทดสอบครั้งแรกเมื่อผลิตเสร็จ (สัปดาห์ที่ 0) และทดสอบครั้งต่อไปทุก 2 สัปดาห์ต่อเนื่องเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยเจือจาง identification panel cells หมายเลข 1-11 เป็น 2% cell suspension ด้วย Alsever's solution เก็บที่อุณหภูมิ 4°C นำมาทดสอบกับแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามข้อกำหนดครั้งละ 1 ชุด เพื่อดูความแรงของแอนติเจนแต่ละชนิด ด้วย conventional tube test (CTT) และ column agglutination technique (CAT) วิธีการทดสอบมีดังนี้

1. Conventional Tube Test (CTT)

เจือจางแอนติบอดีด้วย 1% bovine serum albumin แบบ serial two-fold dilution โดยเริ่มจาก 1:2 จนถึง 1:32 หรือ 1:1024 ขึ้นกับความแรงของแอนติบอดีแต่ละชนิดและนำแอนติบอดีแต่ละ dilution จำนวน 100 ไมโครลิตร มาทดสอบกับ 2% identification panel cells ที่เจือจางใน Alsever's solution 100 ไมโครลิตร[6] incubate ที่อุณหภูมิห้อง (ระยะเวลาในการ incubate ตามคำแนะนำของแอนติบอดีแต่ละชนิด) และปั่นอ่านผลด้วย serofuge centrifuge DiaCent-12 ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ในกรณีที่แอนติบอดีเป็นชนิด IgM ส่วนแอนติบอดีชนิด IgG ใช้วิธีทดสอบแบบ indirect antiglobulin test (IAT)[6] โดยนำไป incubate ที่ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย 0.9% NSS ครั้งสุดท้ายซับให้แห้งแล้วเติม antihuman globulin reagents 2 หยด ปั่นอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลเป็นคะแนน (score) ดังนี้ 4+ = 12 คะแนน 3+ = 10 คะแนน 2+ = 8 คะแนน 1+ = 5 คะแนน และ weak = 2 คะแนน[7]

2. Column Agglutination Technique (CAT)[8,9]

เตรียม 1% identification panel cells ใน ID diluent 1 จากนั้นเติม 1% identification panel cells แต่ละชนิด ลงใน ID-card NaCl/Enzyme 50 ไมโครลิตร และเติมแอนติบอดีชนิด IgM แต่ละ dilution 25 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ปั่นอ่านผลระดับปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็นเกรด 0, 1+, 2+, 3+ และ 4+ และแปลงผลเป็น score เช่นเดียวกับวิธี CTT หากเป็นแอนติบอดีชนิด IgG ใช้ ID-card LISS/Coombs และ incubate 37°C นาน 15 นาที ปั่นอ่านด้วยเครื่อง ID centrifuge นาน 10 นาที ความคงทนของแอนติเจนดูจากคะแนนความแรงเฉลี่ยของแอนติเจนแต่ละชนิด ตรวจวัดตั้งแต่วันที่ผลิตเสร็จ (สัปดาห์ที่ 0) และทดสอบซ้ำทุก 2 สัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 10 นำผลความแรง ในสัปดาห์ที่ 0 สัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 10 มาคำนวณหาความแรงที่ลดลงเฉลี่ยเป็นร้อยละ

ผลการศึกษา

การศึกษาความคงทนของแอนติเจนเมื่อ identification panel cells มีอายุครบ 4 สัปดาห์ พบความแรงของแอนติเจนลดลงแตกต่างกันไป ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ แอนติเจนที่มีความแรงลดลงร้อยละ 0-5 ได้แก่ แอนติเจน c, M, S, s, Le^a, Jk^a, Fy^a, k และ Di^b โดยมีความแรงลดลงร้อยละ 2.53, 3.16, 3.78, 2.04, 4.25, 2.30, 2.22, 0.00 และ ร้อยละ 3.61 ตามลำดับ เมื่อครบ 10 สัปดาห์ มีผลความแรงลดลงที่ 24.65, 27.37, 11.32, 10.08, 12.77, 11.49, 8.88, 35.90 และ 21.69 ตามลำดับ แอนติเจนที่มีความแรงลดลงร้อยละ 6-10 ได้แก่ แอนติเจน D, C, E, e, N, Jk^b และ K โดยมีผลความแรงลดลงร้อยละ 6.15, 6.05, 6.25, 9.09, 7.25, 6.74 และ 6.78 ตามลำดับ เมื่อครบ 10 สัปดาห์ มีผลความแรงลดลงร้อยละ 14.36, 23.96, 27.50, 27.92, 37.68, 29.21 และ 47.46 ตามลำดับ แอนติเจนที่มีความแรงลดลงร้อยละ 10-20 ได้แก่ แอนติเจน P1, Le^b และ Di^a โดยมีผลความแรงลดลงร้อยละ 10.34, 10.71 และร้อยละ 12.00 ตามลำดับ เมื่อครบ 10 สัปดาห์ มีผลความแรงลดลงร้อยละ 34.48, 25.00 และร้อยละ 46.00 ตามลำดับ ส่วนแอนติเจนที่มีความแรงลดลงมากกว่าร้อยละ 20 ได้แก่ แอนติเจน Mi^a และ Fy^b โดยมีผลความแรงลดลงร้อยละ 20.83 และ 20.51 ในสัปดาห์ที่ 10 มีผลความแรงลดลงร้อยละ 52.78 และ 41.88 ตามลำดับ (Table 1)

ความแรงของแอนติเจนระบบ MNS, Kidd และ Duffy ที่มีมีฟีโนไทป์เป็น homozygous และ heterozygous ที่ 4 และ 10 สัปดาห์ พบว่าแอนติเจน M และ N ที่เป็น homozygous (M+M+ และ N+N+) มีผลความแรงที่ 4 สัปดาห์ลดลงร้อยละ 2.04 และ

Table 1 Stability of each antigen at 0-10 weeks indicated by decreasing score percentages when tested against corresponding antibodies

Group of decreasing score (%)	Antigen	N	Starting Score	Decreasing score (%)	
			Week 0	Week 4	Week 10
0-5	c	21	79.00	2.53	24.65
	M	26	47.50	3.16	27.37
	S	9	53.00	3.78	11.32
	s	12	73.50	2.04	10.88
	Le^a	10	47.00	4.25	12.77
	Jk^a	20	43.50	2.30	11.49
	Fy^a	21	45.00	2.22	8.88
	k	33	19.50	0.00	35.90
	Di^b	14	41.50	3.61	21.69
6-10	D	24	97.50	6.15	14.36
	C	22	79.30	6.05	23.96
	E	14	80.00	6.25	27.50
	e	18	77.00	9.09	27.92
	N	16	34.50	7.25	37.68
	Jk^b	20	44.50	6.74	29.21
	K	3	59.00	6.78	47.46
10-20	P1	12	29.00	10.34	34.48
	Le^b	16	28.00	10.71	25.00
	Di^a	7	50.00	12.0	46.00
> 20	Mi^a	10	36.00	20.83	52.78
	Fy^b	8	58.50	20.51	41.88

5.4 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 10 มีความแรงลดลงร้อยละ 20.4 และ 24.32 ตามลำดับ ส่วนที่เป็น heterozygous (M+N+) มีผลความแรงที่ 4 สัปดาห์ลดลงร้อยละ 4.35 และ 9.37 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 10 มีความแรงลดลงร้อยละ 32.61 และ 43.75 ตามลำดับ สำหรับแอนติเจน Jk^a และ Jk^b ที่มีฟีโนไทป์เป็น homozygous Jk(a+b-) และ Jk(a-b+) มีผลความแรงที่ 4 สัปดาห์ลดลงร้อยละ 4.44 และ 4.25 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 10 ลดลงร้อยละ 6.82 และ 25.53 ตามลำดับ ส่วนที่เป็น heterozygous Jk(a+b+) มีผลความแรงที่ 4 สัปดาห์ลดลงร้อยละ 2.32 และ 9.52 ตามลำดับ ส่วนสัปดาห์ที่ 10 ลดลงร้อยละ 16.28 และ 30.95 ตามลำดับ

แอนติเจน Fy^a และ Fy^b ที่มีฟีโนไทป์เป็น homozygous Fy(a+b-) และ Fy (a-b+) พบแอนติเจน Fy^a มีผลความแรงคงเดิมที่ 4 สัปดาห์ ส่วนแอนติเจน Fy^b ลดลงร้อยละ 15.62 และในสัปดาห์ที่ 10 ลดลงร้อยละ 6.52 และ 31.25 ตามลำดับ ส่วนที่เป็น heterozygous Fy(a+b+) พบว่า แอนติเจน Fy^a และ Fy^b มีผลความแรงที่ 4 สัปดาห์ ลดลงร้อยละ 4.55 และ 26.42 และที่ 10 สัปดาห์ลดลงร้อยละ 15.91 และ 54.72 ตามลำดับ (Table 2)

วิจารณ์

จากการศึกษาความคงทนของแอนติเจนในผลิตภัณฑ์ identification panel cells ณ วันหมดอายุ (ที่ 4 สัปดาห์) และเมื่อทดสอบต่อถึงสัปดาห์ที่ 10 ความแรงของแอนติเจนลดลงแตกต่างกันไป แอนติเจนบางระบบเช่น k มีความแรงของแอนติเจนคงเดิมเมื่อถึงวันหมดอายุ และลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อครบ 10 สัปดาห์ แอนติเจน Mi^a เป็นแอนติเจนที่ความแรงลดลงมากที่สุดถึงร้อยละ 20.83 ในสัปดาห์ที่ 4 และลดลงถึงร้อยละ 52.78 ในสัปดาห์ที่ 10 ความแรงของแอนติเจนที่แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของแอนติเจนแต่ละระบบที่แตกต่างกัน เช่นด้าน

Table 2 Decreasing score between homozygous and heterozygous phenotypes of MNS, Kidd and Duffy systems

Antigen	Phenotypes	N	Starting Score	Reducing Score (%)	
			Week 0	Week 4	Week 10
M	M+M+	17	49	2.04	20.40
	M+N+	9	46	4.35	32.61
N	N+N+	7	37	5.40	24.32
	M+N+	9	32	9.37	43.75
Jk^a	Jk(a+b-)	8	44	4.44	6.82
	Jk(a+b+)	12	43	2.32	16.28
Jk^b	Jk(a-b+)	10	47	4.25	25.53
	Jk(a+b+)	10	42	9.52	30.95
Fy^a	Fy^a(a+b-)	15	46	0.00	6.52
	Fy^a (a+b+)	6	44	4.55	15.91
Fy^b	Fy^a (a-b+)	3	64	15.62	31.25
	Fy^a (a+b+)	5	53	26.42	54.72

โครงสร้างของแอนติเจน การเป็น homozygous หรือ heterozygous การมี dosage effect อีกทั้งชนิดของแอนติบอดีที่นำมาทดสอบเป็นชนิด IgM หรือ IgG รวมทั้งการทดสอบความแรงของแอนติเจนในผลิตภัณฑ์ identification panel cells ใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน

ในระบบ Rh ประกอบด้วยแอนติเจนที่สำคัญ 5 ชนิดได้แก่ D, C, E, c และ e ซึ่ง แอนติเจน D มีความเป็นแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุด (high immunogenic) ในการผลิต identification panel cells จะมี D บวก 8 ราย และ D ลบ 3 ราย และแอนติเจนจะมีฟีโนไทป์แตกต่างกันไป เพื่อให้สามารถตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีในระบบ Rh ได้อย่างครอบคลุม ผลการศึกษานี้พบว่าแอนติเจนระบบ Rh มีความแรงลดลงเล็กน้อย โดยแอนติเจน c จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 0-5 โดยมีความแรงลดลงร้อยละ 2.53 ส่วนแอนติเจน D, C, E และ e จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 5-10 มีคะแนนความแรงลดลง คิดเป็นร้อยละ 6.15, 6.05, 6.25 และ 9.09 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนเหล่านี้มีความคงทนดี อาจเนื่องมาจาก บนเซลล์เม็ดเลือดแดงจะมีแอนติเจนในระบบ Rh ถึง 200,000 โมเลกุล ซึ่งแอนติเจนระบบนี้จะทำงานร่วมกับ RHAG (Rh associated glycoprotein) เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (membrane associated polypeptides)[10] อีกทั้งในชุด identification panel cells จะมีเซลล์ในระบบ Rh ที่มีฟีโนไทป์เป็น homozygous เช่น R_1R_1 และ R_2R_2 จำนวนมากกว่าที่เป็น heterozygous เช่น R_1r, R_1R_2 และ R_2r เป็นต้น ดังนั้นเมื่อนำมาเฉลี่ยคะแนนความแรงแล้ว พบว่ามีความแรงลดลงเพียงร้อยละ 6-10 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี ในผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีอ่อนๆ ได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่ง anti-E และ anti-c ที่มักเกิดร่วมกับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ อีกทั้งในระบบนี้จะพบ anti-E ได้บ่อยกว่า anti-D[11, 12] นอกจากนี้ในระบบ MNS แอนติเจน M, S และ s ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 0-5 เช่นเดียวกัน โดยมีคะแนนความแรงของแอนติเจน M และ S ลดลงร้อยละ 3.16 และ 3.78 ตามลำดับ แอนติเจน s ลดลงร้อยละ 2.04 ส่วนแอนติเจน N อยู่ในกลุ่มที่มีคะแนนความแรงลดลงร้อยละ 6-10 โดยลดลงร้อยละ 7.25 แสดงว่ายังมีความคงทนในระดับที่ดี ส่วนใน Miltenberger series หรือแอนติเจน Mi^a เป็น complex antigens เกิดจากการกลายพันธุ์ของ glycophorins A และ glycophrins B ปัจจุบันเรียกว่า variant MNS โดยพบความแรงของแอนติเจนลดลงถึงร้อยละ 20.83 เมื่อวันหมดอายุ จึงอยู่ในกลุ่มที่ลดลงร้อยละ > 20 และลดลงร้อยละ 52.78 ในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งมีความคงทนดีกว่าที่เคยศึกษาไว้ในอดีต[3] อาจเนื่องมาจากปัจจุบันได้มีการตรวจหาชนิดของแอนติเจน (antigen typing) ในเลือดผู้บริจาคเป็นจำนวนมาก เพื่อเตรียมสำรองไว้ผลิตเป็นเซลล์มาตรฐาน ผู้ผลิตจึงมีโอกาสเลือกเลือดบริจาคที่มีแอนติเจนแรงตามต้องการ รวมทั้งยังสามารถตรวจแยก subclasses ของแอนติเจนในระบบนี้ซึ่งเดิมไม่สามารถแยกได้ จึงอาจทำให้ panel cells ขณะนั้นไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ครอบคลุม แอนติเจนใน variant MNS มี 11 subclasses ในคนไทยพบ subclass MiIII เป็นส่วนใหญ่[13] การผลิตเซลล์มาตรฐานจึงเตรียมจากเลือดผู้บริจาคที่มีแอนติเจน Mia(+) ที่เป็น subclass MiIII อย่างน้อย 3 เซลล์ และยังต้อง

สามารถตรวจแยก anti-Mi^a ออกจากแอนติบอดีชนิดอื่นได้[1] ซึ่ง anti-Mi^a ส่วนใหญ่จะเป็นชนิด IgM มีคุณสมบัติเป็น multiple phase thermal antibody อาจเป็นชนิด IgG หรือมี IgG ร่วมด้วย อีกทั้ง anti-Mi^a ยังพบเป็นสาเหตุของ hemolytic transfusion reaction (HTRs) และ hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN)[14] ในผู้ป่วยที่หาเลือดเข้ากันได้ยากพบ anti-Mi^a ได้ถึงร้อยละ 43.3 และเกิดร่วมกับแอนติบอดีชนิดอื่นๆได้ถึงร้อยละ 31.9[12] ระบบ Lewis โครงสร้างพื้นฐานของแอนติเจนในระบบนี้เป็น glycolipid อยู่ในพลาสมา แล้วถูกดูดซับมาอยู่บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ได้เป็นโปรตีนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์[15,16] การศึกษานี้พบว่าแอนติเจน Le^a มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 4.25 ส่วนแอนติเจน Le^b มีความแรงลดลงร้อยละ 10.71 แสดงว่าแอนติเจน Le^a มีความคงทนกว่าแอนติเจน Le^b อย่างไรก็ตามแอนติเจนระบบนี้ยังคงมีความคงทนในระดับที่ดี อาจเนื่องมาจากแอนติเจนถูกทดสอบด้วยวิธี CAT และในขบวนการทดสอบจะเตรียม cell suspension ใน diluents 1[9] ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ bromelin จะช่วยเสริมปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนแอนติบอดีในระบบ lewis[17] ส่วนแอนติเจน P1 มีความแรงแตกต่างกันในแต่ละบุคคล จึงให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกอ่อนจนถึงแรงมาก ซึ่งอาจเกิดจากพันธุกรรมและเชื้อชาติ แอนติเจน P1 เสื่อมได้ง่ายระหว่างการเก็บ ทำให้ความคงทนอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 10-20 anti-P1 ที่เกิดตามธรรมชาติจะมีความแรงแตกต่างกัน ส่วนที่เกิดจากการกระตุ้นโดยตรงจากแอนติเจน P1 พบว่า แอนติบอดีมักจะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 37°C สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ (hemolysis) ใน anti-P1 ที่มีไตเตอร์สูง อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิด hemolytic transfusion reaction (HTRs)ได้[18] ดังนั้นในชุด panel cells จึงต้องมีแอนติเจน P1 อย่างน้อย 4 ราย เพื่อให้สามารถตรวจพบ anti-P1ในผู้ป่วยได้ ในระบบ Kidd แอนติเจน Jk^a มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 2.30 เมื่อสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งน้อยกว่าแอนติเจน Jk^b ที่มีความแรงของแอนติเจนลดลงร้อยละ 6.74 และแอนติเจน ระบบ Kidd ที่นำมาทดสอบ จะเป็น homozygous Jk(a+b-) ถึงร้อยละ 40 (Table 2) รวมทั้งแอนติบอดีที่ใช้เป็นชนิด IgG ถูกทดสอบโดยวิธี CAT ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธี CTT แอนติเจน Jk^b ทดสอบด้วยวิธี CTT อีกทั้งเซลล์ที่นำมาทดสอบมีฟีโนไทป์เป็น heterozygous Jk(a+b+) ถึงร้อยละ 50 เช่นเดียวกับในคนไทยซึ่งพบ Jk(a+b+) ได้ถึงร้อยละ 45-50 ส่วน Jk(a+b-) และ Jk(a-b+) พบได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน แอนติบอดีในระบบ Kidd พบได้บ่อยรองลงมาจาก anti-E, anti-Mi^a และ anti-c ซึ่ง anti-Jk^a เป็นแอนติบอดีที่ซึ่งอาจพบเพียงชนิดเดียวหรือพบร่วมกับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ[12,19,20] หมู่เลือดระบบ Kidd ที่มีฟีโนไทป์เป็น homozygous Jk(a+b−) ใน 1 เซลล์จะมี 14,000 antigen sites ซึ่งมากกว่าที่เป็น heterozygous เท่าตัว ดังนั้นในการผลิต identification panel cells ที่ดี ต้องมีเซลล์ Jk^a และ Jk^b ที่เป็น homozygous อย่างน้อยชนิดละ 2 เซลล์ เพื่อให้สามารถตรวจพบแอนติบอดีในระบบ Kidd ได้ดี เนื่องจากแอนติบอดีของระบบ Kidd ส่วนใหญ่เกิดปฏิกิริยาอ่อนและแสดง dosage effect เช่นเดียวกันกับหมู่เลือดระบบ Duffy, MNS และระบบ Rh นอกจากนี้แอนติบอดีในระบบ Kidd ยังสามารถทำให้เกิด delayed HTRs ได้[2, 21] ระบบ Duffy พบแอนติเจน Fy^a จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 0-5 (Table 1) อาจเนื่องมาจากผู้บริจาคแต่ละรายส่วนใหญ่เป็น homozygous Fy(a+b-) (Table 2) ส่วนแอนติเจน Fy^b มีผลความแรงลดลงถึงร้อยละ 20.51 ในสัปดาห์ที่ 4 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ > 20 และลดลงถึงร้อยละ 41.88 ในสัปดาห์ที่ 10 อาจเนื่องมาจากส่วนใหญ่มีฟีโนไทป์เป็น heterozygous Fy(a+b+) ทำให้มีความแรงต่ำกว่าที่เป็น homozygous แอนติเจน Fy^a และ Fy^b สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ตั้งครรภ์ได้ 6 สัปดาห์ และจะสร้างได้ดีเมื่อแรกคลอด แอนติเจนระบบ Duffy ที่เป็น homozygous จะมี antigen sites บน RBC ประมาณ 13,000 ถึง 14,000 antigen sites และจะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเป็น heterozygous Fy (a+b+)[22] ระบบ Kell แอนติเจน k อยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 0-5 มีความคงทนกว่าแอนติเจน K ที่อยู่ในกลุ่มที่มีความแรงลดลงร้อยละ 6-10 เนื่องจากแอนติเจน k ส่วนใหญ่เป็น homozygous (k+k+) ส่วนแอนติเจน K เป็น heterozygous ทั้งหมด (K+k+) แอนติเจน K ในคนผิวขาวพบประมาณร้อยละ 9 และมักเป็นปัญหาต่อการให้เลือดและทำให้เกิด HDFN ได้[23] อีกทั้งแอนติเจน K มีความเป็นแอนติเจนสูงมาก (high immunogenic) สามารถกระตุ้นให้ภูมิคุ้มกันของผู้รับเลือดสร้างแอนติบอดีได้ดี ดังนั้น identification panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยจึงพยายามจัดให้มีแอนติเจน K อย่างน้อย 1 เซลล์ เพื่อให้สามารถตรวจพบ anti-K ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ ส่วนใน screening cells อาจมีได้เพียงบางรุ่นการผลิต เนื่องในคนไทยพบแอนติเจน K น้อยมาก ซึ่งในผู้บริจาคโลหิตบางรายจะเป็น Rh negative และบางรายไม่มีแอนติเจนอื่นที่สำคัญ จึงไม่สามารถจัดเข้าชุดกับรายอื่นเพื่อผลิตเป็นเซลล์มาตรฐานได้ จากข้อมูลของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ พบผู้บริจาคโลหิตที่เป็น *KK* เพียงร้อยละ 0.07 แต่เนื่องจากผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ มีชาวต่างชาติทั้งผิวขาวและผิวดำรวมอยู่ด้วย จึงอาจจะสูงกว่าที่ควรเป็น ส่วนผู้บริจาคที่มียีนเป็น *Kk* พบได้ร้อยละ 1.78 อีกร้อยละ 98.16

จะเป็น *kk*[24] แอนติเจน k ใน identification panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ส่วนใหญ่มีฟีโนไทป์เป็น homozygous จึงมีความคงทนดีกว่าแอนติเจน K ซึ่งเป็น heterozygous ระบบ Diego พบแอนติเจน Di^b มีความคงทนดีกว่าแอนติเจน Di^a โดยมีความแรงลดลงเพียงร้อยละ 3.61 ส่วน Di^a มีความแรงลดลงที่ร้อยละ12.00 อาจเนื่องจากแอนติเจน Di^b ส่วนใหญ่เป็น homozygous Di(a-b+) ในขณะที่แอนติเจน Di^a เป็น heterozygous ทั้งหมด Di(a+b+) รวมทั้งวิธีทดสอบเป็น CTT ส่วนแอนติเจน Di^b ทดสอบโดยวิธี CAT ซึ่งมี sensitivity ดีกว่า วิธี CTT Anti-Di(a) ยังพบเป็นสาเหตุของ HTRs และ HDFN[25-28] แอนติเจน Di^a ในคนผิวขาวพบได้น้อยมากเช่นเดียวกับแอนติเจน Mi^a แต่พบมากในคนผิวเหลือง จึงทำให้โรงพยาบาลที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติในการตรวจวิเคราะห์ทางธนาคารเลือดที่ต้องใช้เซลล์มาตรฐานของทางยุโรป จึงไม่มีแอนติเจนดังกล่าว ดังนั้นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จึงจัดเตรียมเซลล์มาตรฐานให้มีแอนติเจน Di^a และ Mi^a ทุกรุ่นการผลิต ทั้ง panel cells และ screening cells อีกทั้งยังมีบริการ screening cells O_3 ซึ่งประกอบด้วยแอนติเจนหลัก 2 ชนิดคือ Mi^a และ Di^a เพื่อช่วยให้โรงพยาบาลต่างๆ ที่ใช้ reagent red cells ของต่างประเทศ ได้มีเซลล์มาตรฐานซึ่งมีแอนติเจนที่สำคัญครบทุกระบบ จากการศึกษานี้สามารถสร้างความเชื่อมั่นได้ว่า panel cells และผลิตภัณฑ์เซลล์อื่นๆ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ มีความคงทนของแอนติเจนดีตลอดระยะเวลาการใช้งาน

สรุป

จากการศึกษาความคงทนของแอนติเจนครั้งนี้พบว่า แม้ identification panel cells จะมีอายุครบ 1 เดือนแล้วก็ตาม แต่ความแรงของแอนติเจนยังคงอยู่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 80 นับจากวันที่ผลิตเสร็จเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C ดังนั้นจึงสามารถนำเซลล์ที่มีแอนติเจนที่หายาก (rare antigen) บางชนิด เช่น K(+) และ Fy(a-) มาใช้เป็น extra cells ในการตรวจยืนยันร่วมกับชุดอื่นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการช่วยแปลผลการทดสอบเพื่อตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีและตรวจแยกชนิดของ multiple antibodies เพื่อการจัดหาเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยที่ต้องการรับเลือด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พญ.สร้อยสอางค์ พิกุลสด และ คุณทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช ที่ได้ริเริ่มและวางรากฐานการผลิตเซลล์มาตรฐาน และขอขอบคุณ นาวาโทหญิง พญ.อุบลวัณณ์ จรูญเรืองฤทธิ์ ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนและส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เซลล์มาอย่างต่อเนื่อง”

เอกสารอ้างอิง

1. *Sakuldamrongpanich T. Production of panel and screening Cells. J Hematol Transfus Med. 2013;23:153-60.*
2. *Westhoff CM and Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. Immunohematology. 2004;20:37-49.*
3. *Mekchay S, Kerdkaewngam K. Stability of blood group antigens in panel cells prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. In: Chiewsil P, Phikulsod S, eds. The National Conference on Transfusion Medicine: 2003 Bangkok: National Blood Centre, Thai Red Cross Society. 2004:101.*
4. *Product information: 2 in bio CSL Immuno haematology (product leaflet) Web: http://www.biocsl.com.au/IH*
5. *Jewett-Keefe B, Block J. Comparison of Antigen Stability between Three Manufacturers of Reagent Red Cells. Carolinas Medical Center. Available from: http://www.mediondiagnostics.us/pdfs/Medion%20Cell%20Stability.pdf*
6. *Walker PS, Hamilton JR. Identification of antibodies to red cell antigens. In: Funk MK, Rossman BJ, Hillyer CD,Westhoff CM, eds. Technical manual. 18th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks. 20014:391-421.*
7. *Reading and grading tube agglutination. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks. 2008:876.*
8. *Harmening DM. Alternative technologies and automation in routine blood bank testing. In: Modern blood banking and transfusion practices. 5th ed. Thailand: Book Promotion & Service. 2005:293-6.*
9. *DiaMed-ID Microtyping System, Direction for use, DiaMed AG, Switzerland. 1991.*
10. *Nicolas V, Kim CLV, Gane P, Birkenmeier C, Cartron JP, Colin Y, et al. Rh-RhAG/Ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeletol is impaired by Rh null-associated mutation. J Biol Chem. 2003;278:25526-33.*
11. *Bejrachandra S, Chandanayingyong D. Unexpected red cell antibodies in donors and patients at Siriraj Hospital. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 1979;10:204-6.*
12. *Kupatawintu P, Emthip M, Sungnoon D, et al. Unexpected antibodies of patients' blood samples sent for testing at National Blood Centre. National Blood Centre, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med. 2010;20:255-62.*
13. *Chandanyingyong D. Transfusion Medicine. Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand. 1998:86-96. (in Thai)*
14. *Kirdkaewngam K, Tubrod J, Tingtoy U, Termchairoj W, Oota S. Testing of synthetic blood Group antigen MUT/Mur kodecytes with anti-Mia in blood donors. J Hematol Transfus Med. 2011;21: 229-33.*
15. *Harmening DM, Taghizadeh M. The Lewis system. In: Harmening DM, ed. Modern blood banking and transfusion practices, 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis. 1999:145-60.*
16. *Combs MR. Lewis blood group system review. Immunohematology. 2009;25:112-8.*

17. *Pirofsky B, Mangum MEJ. Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc Soc Exp Biol Med. 1959;54:640-9.*
18. *Moureau P. Les reactions post-transfusion cells. Revue Belge Sci Med. 1945;16:258-300.*
19. *Reid ME, Lomas-Francis C. Blood group antigen factsbook. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. 2004.*
20. *Chandanayingyong D. Common problems in routine pre-transfusion testing. Southeast Asian J Trop Med Pub Health. 1979; 10:193-5.*
21. *Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th ed. Oxford: Blackwell scientific publications, 1975.*
22. *Daniel G. The Human Blood Group. 2nd ed. Blackwell Science, Oxford. 2002.*
23. *Mattaloni SM, Arnoni C, Céspedes R, Nonaka C, Boggione CT, Luján ME, et al. Clinical significance of an alloantibody against the Kell blood group glycoprotein. Transfus Med Hemother. 2017;44:53-7.*
24. *Fongsarun J, Nuchprayoon I, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood groups in Thai blood donors. J Hematol Transfus Med. 2002;12:277-86.*
25. *Hinckley ME, Huestis DW. Case report: An immediate hemolytic transfusion reaction apparently caused by anti-Di(a) Rev Fr Transfus Immunohematology. 1979;22:581-5.*
26. *Tohyama H. Blood transfusion reaction due to Diego blood group. Tokyo: Chuugai Medical Publishers. 1989:379-80.*
27. *Kusnierz-Alejska G, Bochenek S. HDN due to anti-Di(a) and incidence of the Di(a) antigen in Poland. Vox Sang. 1992;62:124-6.*
28. *Chung MA, Park EH, Lee CH, Oh CH, Namgung R, Kim HO, et al. A case of hemolytic disease in the newborn due to anti-Di(a) antibody. J Korean Soc Neonatal. 2002;8:141-4.*