

การประยุกต์วิธีตรวจหาแอนติเจน D ในโลหิตผู้บริจาคด้วยวิธีสไลด์
และใช้น้ำยาแอนติ D เจือจางเพื่อลดต้นทุน
The cost effectiveness of applied method
for detecting antigen-D in donated blood using slide technique
and diluted anti-D solution

สุทธิณี จันทรสวรรณ์, วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)*

Sutinee Jansuwan, MT.*

*กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลน่าน จังหวัดน่าน ประเทศไทย 55000

*Department of medical technology, Nan Hospital, Nan Province, Thailand, 55000

Corresponding author. E-mail address: ochin_noi@hotmail.com

บทคัดย่อ

หลักการและเหตุผล : การประยุกต์การตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์ ซึ่งทำจากแผ่นโฟมก้ำ ขนาด 30 x 40 cm. ที่มีการแบ่งช่องสำหรับการทดสอบได้ 90 ช่องเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งละจำนวนมากโดยใช้น้ำยาแอนติ D เจือจางเพื่อลดต้นทุนและประหยัดเวลาในการทดสอบ

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาแอนติ D เจือจาง ที่ใช้ในการตรวจแอนติเจน D ในโลหิตผู้บริจาคด้วยวิธีการตรวจบนแผ่นสไลด์ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อลดต้นทุนและระยะเวลาในการทดสอบ

สถานที่ศึกษา : โรงพยาบาลน่าน จังหวัดน่าน

รูปแบบงานวิจัย : การศึกษาแบบดัดแปลงและเปรียบเทียบทดสอบการวินิจฉัย

วิธีการศึกษา : ใช้กลุ่มตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตในโรงพยาบาลน่านจำนวน 8,396 ราย ระหว่างวันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2562 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2562 ในการตรวจหาแอนติเจน D บนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคด้วยวิธีสไลด์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยหยดน้ำยาแอนติ D ที่เจือจาง 1:16 ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วใช้ไม้เขี่ยตะเกียบให้ติดปลายไม้ของเม็ดเลือดแดงที่ต้องการทดสอบ (stick method) ผสมกับน้ำยาที่หยดไว้บนสไลด์ให้เข้ากันแล้วสังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงภายในเวลา 2 นาทีแล้วอ่านผลด้วยตาเปล่าหากผลการทดสอบในรายที่ให้ผลลบต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วย Indirect Antiglobulin Test (IAT) เพื่อยืนยันผลการทดสอบเป็น Rh negative หรือ weak D

- ผลการศึกษา** : พบว่า การตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์ ให้ผลบวก (Rh positive) 8,375 ราย (ร้อยละ 99.8) และให้ผลลบ 21 ราย (ร้อยละ 0.3) เมื่อนำตัวอย่างเลือดที่ให้ผลลบตรวจเพิ่มเติมด้วย Indirect Antiglobulin Test พบว่าให้ผลลบทั้ง 21 ราย รายงานผลเป็น Rh negative
- สรุป** : การตรวจแอนติเจน D ด้วยน้ำยาแอนติ D เจือจาง 1:16 โดยการตรวจบนแผ่นสไลด์ให้ผลถูกต้องสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน อีกทั้งสามารถลดต้นทุนได้ถึง 16 เท่า และช่วยลดเวลาในการทดสอบ โดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างเลือดจำนวนมากที่ต้องทดสอบในเวลาเดียวกัน
- คำสำคัญ** : แอนติเจน D น้ำยาแอนติ D เจือจาง

วารสารการแพทย์โรงพยาบาลศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ 2563;35(1): 157-167

ABSTRACT

- Background** : Application of the detection of antigen D by slide method, which is made from Formica plates 30 x 40 cm with 90 compartments for mass testing. Using anti-D solution to reduce costs and time.
- Objective** : This study aimed to examine the effect of using slide technique along with diluted anti-D solution, an applied method, to detect antigen-D.
- Setting** : Nan Hospital, Nan Province
- Design** : Diagnostic test
- Methods** : A total of 8,396 donated blood samples in Blood Bank Department, Nan Hospital, were recruited during March and August 2019. The slide technique in combination with diluted 1:16 anti-D solution with red cell by stick method and the test results were interpreted with naked eyes. If the negative result was shown, the standard test tube technique would be applied to confirm by Indirect Antiglobulin Test (IAT) whether blood sample was Rh negative or weak D.
- Results** : The findings of this study revealed that an applied technique illustrated the positive result (Rh positive) in 8,375 blood specimens (99.8%) and the negative result in 21 specimens (0.3%).

The confirmation method using indirect antiglobulin test to identify 21 specimens with the negative result indicated that all were Rh negative.

Conclusion : Detecting antigen-D by using the slide technique and diluted anti-D solution provides similar end result when compared with the standard test. Moreover, this applied technique is cost-effective and save time, especially when having a number of donated blood samples needed to be tested at the same time.

Keywords : antigen D, diluted anti-D, solution

Med J Srisaket Surin Buriram Hosp 2020;35(1): 157-167

หลักการและเหตุผล

หมู่โลหิตระบบ Rh มีความสำคัญทางคลินิกกรองลงมาจากหมู่โลหิตระบบ ABO เนื่องจากทำให้เกิดปฏิกิริยา Hemolytic transfusion reaction (HTR) และ Hemolytic disease of the newborn (HDN) แอนติเจนที่สำคัญของหมู่โลหิตระบบนี้ประกอบด้วยแอนติเจน 5 ชนิดคือ D C c E และ e ซึ่งแอนติเจนแต่ละชนิดสามารถกระตุ้นให้ร่างกายของคนที่ไม่ใช่แอนติเจนเหล่านั้นสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะขึ้นมาได้คือ anti-D, anti-C, anti-c, anti-E และ anti-e โดยแอนติบอดีเหล่านี้ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจากการได้รับโลหิตหรือการตั้งครรภ์และส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG ดังนั้นจึงมักพบปัญหา delayed hemolytic transfusion reaction ในผู้ป่วย แอนติเจน D เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญเพราะมี immunogenicity สูงที่สุดและเป็นแอนติเจนที่กำหนดความเป็น Rh positive หรือ Rh negative โดยหากตรวจพบแอนติเจน D บนผิวเม็ดโลหิตแดงจะแสดง phenotype เป็น Rh positive หากตรวจ

ไม่พบแอนติเจน D บนผิวเม็ดโลหิตแดงจะแสดง phenotype เป็น Rh negative คนไทยส่วนใหญ่เป็น Rh positive ร้อยละ 97.7 และพบ Rh negative เพียงร้อยละ 0.3 เท่านั้นแต่ในคนผิวขาวพบได้ประมาณร้อยละ 15⁽¹⁻³⁾ หมู่โลหิตระบบ Rh มีความสำคัญทางคลินิกเพราะเมื่อผู้ป่วยที่เป็น Rh negative ได้รับโลหิตหรือส่วนประกอบโลหิตที่เป็น Rh positive จะมีการสร้างแอนติ D ได้สูงถึงร้อยละ 80⁽⁴⁾ ซึ่งเป็นปัญหาของการเกิด HTR และ HDN ปัจจุบันการตรวจแอนติเจน D ของหมู่โลหิตระบบ Rh คือวิธีซีโรโลยีน้ำยาตรวจ monoclonal anti-D ที่ใช้มีทั้งแบบ IgM, IgG และ IgM+IgG โดยน้ำยาตรวจแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันเช่น ราคาความแรง (titer) ของน้ำยาเป็นต้น

เทคนิคการตรวจแอนติเจน D^(2,3)

การตรวจแอนติเจน D เพื่อแยกบุคคลเป็น Rh positive และ Rh negative หรือ weak D สามารถทำได้โดยวิธีพื้นฐานทางซีโรโลยีซึ่งเป็นวิธี

มาตรฐานทั่วไปของห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือดโดยการทดสอบเม็ดโลหิตแดงกับ monoclonal anti-D ชนิด IgM+IgG การตรวจดังกล่าวทำได้ 2 วิธีคือบนแผ่นสไลด์ (slide test) และในหลอดทดลอง (tube test) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ในกรณีของวิธีสไลด์นั้นบอกได้เฉพาะ Rh positive หรือ Rh negative เท่านั้น ดังนั้นกรณีที่ผลการทดสอบของเม็ดโลหิตแดงกับแอนติ D ที่อุณหภูมิห้องให้ผลลบจะไม่สามารถสรุปว่าเป็น Rh negative ต้องทำการทดสอบต่อไปจนถึงขั้นตอน Indirect antiglobulin test (IAT) ในหลอดทดลอง หากปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดโลหิตแดงเป็นลบทุกขั้นตอนจึงสามารถสรุปได้ว่าเป็น Rh negative แต่วิธีหลอดทดลองต้องใช้หลอดทดลองในการทดสอบและทำให้ไม่สะดวกต่อการตรวจในกรณีที่มีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก (mass screening) จากรายงานของงานวิจัยในต่างประเทศได้มีการพัฒนาการตรวจหมู่เลือดระบบต่างๆ ด้วยวิธีอื่นเพื่อลดปัญหาดังกล่าว เช่นการตรวจด้วยวิธีเจล⁽²⁾ การตรวจด้วยวิธีไมโครเพลท^(2,5,6) เป็นต้น ในประเทศไทยได้มีการพัฒนารูปแบบในการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทอย่างต่อเนื่อง เช่น งานวิจัยของ อมรรัตน์ ร่มพุกษ์ และคณะ⁽⁷⁾ ได้ทำการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลท (รูปตัววี) โดยเติม 1% papain เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาและใช้แอนติ D เจือจาง 1:200 ตั้งเพลทไว้ 1 ชั่วโมงจึงจะอ่านผลได้ และต่อมามาลินี มีแสง⁽⁸⁾ ได้ทำการประยุกต์ใช้น้ำเกลือแทน 1% papain เพื่อลดขั้นตอนในการเตรียม 1% papain ซึ่งทั้ง 2 งานวิจัย

นี้มีข้อเสียคือต้องใช้เวลาดังเพลทไว้ 1 ชั่วโมงจึงจะอ่านผลได้จึงมีงานวิจัยของพัฒนศิริ อังกลสิทธิ์และคณะ⁽⁹⁾ ที่ช่วยลดระยะเวลาในการอ่านผลในวิธีไมโครเพลทแต่ต้องใช้น้ำยา low ionic strength (LISS) เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาทดสอบกับน้ำยาแอนติ D ที่เจือจาง (1:50) เขย่าเพลทด้วยเครื่องเขย่า 40 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไมโครเพลท นาน 1 นาที หลังจากนั้นเขย่าไมโครเพลท นาน 2 นาที เคาะที่มุมเพลทเบาๆ แล้วอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งพบว่าวิธีเหล่านี้มีความไวสูงและสะดวกสำหรับการตรวจกับตัวอย่างทดสอบจำนวนมากใช้น้ำยาแอนติ D น้อยลงแต่ต้องรอนานในการอ่านผลและยังมีส่วนเพิ่มในการซื้อน้ำยาที่ใช้เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาทำให้มีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยากรวมทั้งต้องมีอุปกรณ์ช่วยในการเขย่าและปั่นไมโครเพลท ปัจจุบันนี้ในงานธนาคารเลือดโรงพยาบาลน่านได้ตรวจแอนติเจน D ของผู้บริจาคโลหิตบนแผ่นสไลด์ โฟเมก้าที่แบ่งช่องจำนวน 90 ช่องซึ่งสามารถตรวจได้ครั้งละ 90 รายโดยเฉพาะเมื่อมีการออกรับบริจาคโลหิตนอกสถานที่ได้เลือดบริจาคครั้งละ 80-150 คน ถ้ารวมกับการรับเลือดบริจาคภายในโรงพยาบาลน่านจะมีการตรวจหาแอนติเจน D มากถึงเดือนละ 1,000-1,200 ราย ดังนั้นเพื่อช่วยลดต้นทุนของการตรวจหาแอนติเจน D ผู้วิจัยจึงได้ทำการเจือจางน้ำยาแอนติ D และประเมินผลการเจือจางน้ำยาแอนติ D ดังกล่าว พบว่าผลตรวจยังมีความถูกต้องและสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน^(2,5,6)

กรอบแนวคิดการวิจัย

การตรวจหาแอนติเจน D ในโลหิตบริจาดด้วยวิธีมาตรฐาน คือการทดสอบโดยใช้หลอดทดลองและใช้น้ำยาแอนติ D ชนิดเข้มข้น ซึ่งต้องใช้น้ำยาแอนติ D ในปริมาณมากและใช้เวลานาน จึงมีผู้ประยุกต์วิธีการตรวจหาแอนติเจน D โดยวิธีไมโครเพลท^(2,5,6) หรือวิธีเจล⁽²⁾ มาทดแทนวิธีหลอดทดลอง ทั้งนี้วิธีการดังกล่าวใช้เวลานานและต้นทุนที่ค่อนข้างสูงตามลำดับ จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาและประยุกต์ในการตรวจหาแอนติเจน D โดยเทคนิคสไลด์ร่วมกับการใช้แอนติ D ที่เจือจางมาใช้ในการตรวจดังกล่าวเป็นวิธีการทำที่ง่ายขึ้น รวดเร็วขึ้น ไม่ต้องเสียเวลาในการล้างหลอดทดลองในปริมาณมาก และประหยัดงบประมาณในการซื้อน้ำยาแอนติ D

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจแอนติเจน D ในโลหิตผู้บริจาคด้วยวิธีสไลด์โดยใช้น้ำยาแอนติ D เจือจางเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
2. เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการตรวจแอนติเจน D ในโลหิตผู้บริจาคของโรงพยาบาลน่าน

วิธีการศึกษา

วิธีการศึกษาเป็นรูปแบบของการศึกษาแบบตัดแปลงและเปรียบเทียบทดสอบการวินิจฉัย โดยใช้ตัวอย่างทดสอบเป็น 35-45% เซลล์เม็ดเลือดแดงจาก clotted blood ของผู้บริจาคโลหิตในโรงพยาบาลน่านตัวอย่างละ 2-3 มิลลิลิตร และรักษาสภาพตัวอย่างไว้ได้โดยเก็บไว้ในอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เริ่มเก็บตัวอย่างศึกษาตั้งแต่วันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2562 ถึง วันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 8,396 ราย

วัสดุอุปกรณ์

1. น้ำยา Anti-D ชนิด IgM+IgG (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย Lot. 61024)
2. 35-45% Rh positive control cells: Panel cells (Rr) (panel cells ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย Lot. 62070 และ Lot. 62080)
3. 35-45% Rh negative control cells: Panel cells (rr) (panel cells ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย Lot. 62070 และ Lot. 62080)
4. น้ำยา Antihuman globulin (AHG) ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย Lot. 62011
5. น้ำเกลือ 0.9%
6. แผ่นสไลด์โฟเมกามี 90 ช่อง
7. ไมสำหรับเขี่ยเซลล์เม็ดเลือดแดง
8. Test tube ขนาด 10 x 75 mm
9. serological centrifuge
10. นาฬิกาจับเวลา

วิธีการ

1. การทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรวจแอนติเจน D โดยเทคนิคสไลด์

1.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติ D

เจือจางน้ำยาแอนติ D ด้วยน้ำเกลือที่ค่าการเจือจางดังนี้ 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 และ 1:128 ตามลำดับหยดแอนติ D ที่ไม่เจือจางและที่เจือจางแต่ละค่าเจือจางลงบนสไลด์ที่เขียนกำกับไว้หลุมละ 1 หยดแล้วใช้ไม้เขี่ย

การอ่านผล ผลบวก (+) พบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
 ผลลบ (-) ไม่พบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

1.2 การศึกษาความคงตัวของแอนติ D ที่เจือจางในน้ำเกลือ (stability)

เตรียมแอนติ D ที่เจือจางในน้ำเกลืออัตราส่วน 1:16 แล้วแบ่งเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำแอนติ D ดังกล่าว ทดสอบคุณภาพด้วยการทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Rh positive และ Rh negative ซึ่งเป็น control cells ที่มีความเข้มข้น 35-45% ด้วยวิธีสไลด์ บันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นภายในเวลา 2 นาทีโดยให้ทดสอบทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์

2. การตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์และเทคนิคการเติมเซลล์โดยใช้ไม้เขี่ยเซลล์ (stick method)⁽¹⁰⁾

ทำการตรวจแอนติเจน D ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตโดยวิธีสไลด์ใช้น้ำยาแอนติ D ชนิดเจือจาง 1:16 เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลองไม่เจือจางน้ำยาแอนติ D ตาม

และเลือดให้ติดปลายไม้ของเม็ดเลือดแดง Rh positive (stick method)⁽¹⁰⁾ ผสมกับน้ำยาที่หยดไว้บนสไลด์ให้เข้ากันแล้วเอียงสไลด์ไปมาเพื่อให้ส่วนผสมของเม็ดเลือดแดงและแอนติ D ให้เข้ากันแล้วสังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงภายในเวลา 2 นาทีและเม็ดเลือดแดง Rh negative ก็ทำเช่นเดียวกัน จากนั้นบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นในแต่ละค่าการเจือจางตามตารางที่ 1

มาตรฐานในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์ได้กำหนดให้ 2 หลุมแรกเป็น positive control (Rh positive) และ negative control (Rh negative) เติมนเซลล์ positive control และ negative control โดยใช้ไม้เขี่ยเลือดแต่ละเลือดที่ต้องการตรวจลงในหลุมที่เขียนกำกับไว้หลังหยดน้ำยาแอนติ D เจือจาง (1:16) ลงสไลด์หลุมละ 1 หยดตรวจครั้งละ 10 หลุมหมุนสไลด์ไปมาอ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงภายใน 2 นาทีและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงการอ่านผลการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์ถ้าให้ผลบวกจะเห็นมีลักษณะเม็ดเลือดแดงจับตัวกันเป็นก้อนสำหรับผลลบไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะต้องนำมาตรวจยืนยันว่าเป็น Rh negative หรือ weak D ด้วยวิธี Indirect antiglobulin test (IAT) โดยใช้หลอดทดลองตามตารางที่ 3

ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจแอนติเจน D โดยการเจือจางน้ำยาโดยวิธีสไลด์

Type	Undi-luted	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
RBC Rh positive	+	+	+	+	+	+	-	-
RBC Rh negative	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 การศึกษาความคงตัวของน้ำยาแอนติ D ที่เจือจางในน้ำเกลือ (stability)

Type/ week	1	2	3	4
RBC Rh positive	+	+	+	+
RBC Rh negative	-	-	-	-

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการตรวจแอนติเจน D ทั้ง 2 วิธี

วิธีการตรวจ	จำนวนทั้งหมด	Rh positive	Rh negative
วิธีหลอดทดลองและแอนติ D ที่ไม่เจือจาง	8,396	8,375	21
วิธีสไลด์และแอนติ D เจือจาง 1:16	8,396	8,375	21

ตารางที่ 4 ตารางคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

ผลการเกิดปฏิกิริยา	วิธีหลอดทดลองและแอนติดี			รวม
		ที่ไม่เจือจาง		
		ผลบวก	ผลลบ	
วิธีสไลด์และแอนติ D	ผลบวก	8,375	0	8,375
เจือจาง 1:16	ผลลบ	0	21	21
	รวม	8,375	21	8,396

สูตรคำนวณทางสถิติ

1. การศึกษาความไว (Sensitivity)

$$\% \text{ Sensitivity} = \frac{TP \times 100}{(TP + FN)} = \frac{(8,375 \times 100)}{8,375} = 100$$

2. การศึกษาความจำเพาะ (Specificity)

$$\% \text{ Specificity} = \frac{TN \times 100}{(TN + FP)} = \frac{(21 \times 100)}{21} = 100$$

3. Positive predictive value (PPV)

$$\% \text{ PPV} = \frac{TP \times 100}{(TP + FP)} = \frac{(8,375 \times 100)}{8,375} = 100$$

4. Negative predictive value (NPV)

$$\% \text{ NPV} = \frac{TN \times 100}{(TN + FN)} = \frac{(21 \times 100)}{21} = 100$$

ผลการทดสอบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติ D ที่ไม่เจือจางและที่เจือจางด้วยน้ำเกลือดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 1 พบว่าเม็ดเลือดแดง Rh positive เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มภายในเวลา 2 นาทีในหลุมที่ใช้ แอนติ D แบบไม่เจือจาง (undiluted anti-D) และหลุมที่เติมแอนติ D ที่มีค่าการเจือจาง 1:2 ถึง 1:32 ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้แอนติบอดีที่ค่าเจือจาง 1:16 เป็นค่าการเจือจางที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอมจากการภาวะ post-zone หรือการเกิดปฏิกิริยาที่มีความแรงน้อยจนไม่สามารถพบการจับกลุ่มที่เห็นชัดเจนได้ สำหรับการทดสอบกับเม็ดเลือดแดง Rh negative นั้นให้ผลลบคือไม่พบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงทุกหลุม แสดงให้เห็นว่าการเจือจาง แอนติ D ที่ 1:16 ไม่ส่งผลให้เกิดผลบวกปลอม

ผู้วิจัยได้ทดสอบความคงตัวของน้ำยาแอนติ D ที่เจือจาง 1:16 พบว่าเมื่อเก็บน้ำยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์โดยนำมาทดสอบกับเม็ดเลือดแดง

Rh positive (Rr) และ Rh negative (rr) สัปดาห์ละครั้ง ผลการทดสอบพบว่าแอนติ D ที่เจือจาง 1:16 ให้ผลบวกกับเม็ดเลือดแดง Rh positive และให้ผลลบกับเม็ดเลือดแดง Rh negative ทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบให้ผลตามตารางที่ 2 โดยไม่พบผลลบปลอมหรือผลบวกปลอม จึงสามารถสรุปได้ว่าแอนติ D ที่เจือจาง 1:16 ไม่เสื่อมสภาพ และสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

การตรวจแอนติเจน D ในผู้บริจาคทั้งหมดจำนวน 8,396 ราย ด้วยน้ำยาแอนติ D เจือจาง 1:16 โดยวิธีสไลด์เปรียบเทียบกับวิธีหลอดทดลอง พบ Rh positive 8,375 ราย (ร้อยละ 99.8) Rh negative 21 ราย (ร้อยละ 0.3) เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลลบมาตรวจยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธีหลอดทดลองถึง indirect antiglobulin test (IAT) ให้ผลลบทั้ง 21 ราย จากการศึกษาค่าความจำเพาะการทำนายผลบวกและการทำนายผลลบ ตามตารางที่ 4 ได้ผลทางสถิติในเกณฑ์ดี

วิจารณ์

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้ใช้น้ำยาแอนติ ดีชนิด IgM+ IgG ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยซึ่งสามารถตรวจพบได้ทั้ง weak D และ partial D antigen มาใช้ในการศึกษาและได้ทำการตรวจยืนยัน Rh negative ด้วยวิธี Indirect Antiglobulin Test (IAT) โดยใช้หลอดทดลองงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีสไลด์และน้ำยา แอนติ D ที่ค่าเจือจาง 1:16 และการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ใช้ในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีใช้ไม้จิ้มเซลล์ (stick method)(10) นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบหาความคงตัวของน้ำยาแอนติ D ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าคุณภาพของน้ำยาแอนติ D ที่เจือจางและแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้นเมื่อนำมาใช้ในการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์อย่างไรก็ตามสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการนำวิธีนี้ไปใช้จำเป็นจะต้องทดสอบหาความแรงที่เหมาะสมของน้ำยาแอนติ D ก่อนการนำไปใช้ทุกครั้งเนื่องจากน้ำยาของแต่ละบริษัทมีความแรงและความไวที่แตกต่างกัน

ในการศึกษานี้พบว่าผลการทดสอบจำนวนผู้บริจาคทั้งหมดจำนวน 8,396 ราย พบ Rh positive 8,375 ราย (ร้อยละ 99.8) Rh negative 21 ราย (ร้อยละ 0.3) ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับผลการทดสอบแบบหลอดทดลองซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานถึงแม้ว่าการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์จะให้ผลการตรวจที่แยกระหว่างผลบวกกับผลลบได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า แต่ยังมีข้อจำกัดในกรณีที่ได้ผลลบจะไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น Rh negative หรือ weak D ต้องนำตัวอย่างที่ให้ผลลบมาทดสอบซ้ำโดยวิธีหลอดทดลองและ

ปฏิบัติตามคู่มือการทดสอบที่แนบมากับน้ำยาแอนติ D ซึ่งการทดสอบซ้ำจะใช้แอนติ D เข้มข้นเมื่อผลการทดสอบยังคงให้ผลลบต้องทำการทดสอบยืนยันเพิ่มเติมทุกครั้งด้วยวิธี Indirect Antiglobulin Test (IAT) เมื่อผลการทดสอบเป็นลบให้รายงานผลเป็น Rh negative ถ้าให้ผลบวกให้รายงานผลเป็น weak D แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการตรวจแอนติเจน D ด้วยวิธีไมโครเพลทที่ใช้การเจือจางน้ำยา anti D⁽⁷⁻⁹⁾ ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำแต่มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการอ่านผลต้องมีน้ำยาที่ใช้เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยา และใช้อุปกรณ์เพิ่มเติมเช่นไมโครเพลทเครื่องเขย่าไมโครเพลทและเครื่องอ่านไมโครเพลท

จากการศึกษานี้ช่วยลดต้นทุนน้ำยาแอนติ D ได้ถึง 16 เท่า เพราะน้ำยาแอนติ D 1 ขวดราคา 200 บาทมีปริมาณ 10 มิลลิลิตร ในการตรวจหาแอนติเจน D บนเม็ดเลือดแดงของตัวอย่างเลือด 1 ราย ใช้น้ำยาแอนติ D 1 หยด (50 ไมโครลิตร) ดังนั้นน้ำยา 1 ขวดสามารถตรวจหาแอนติเจน D ได้ประมาณ 200 ราย ถ้านำน้ำยาแอนติ D มาเจือจาง 1:16 จะเพิ่มปริมาณน้ำยาแอนติ D ได้ 16 ขวด ในปี พ.ศ. 2561 มีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 15,252 คน ต้องใช้น้ำยาประมาณ 77 ขวดคิดเป็นมูลค่า 15,400 บาท แต่เมื่อเจือจางน้ำยาแอนติ D ที่ 1:16 เพียง 5 ขวดจะได้น้ำยาแอนติ D เจือจางถึง 80 ขวดมูลค่า 1,000 บาท ช่วยลดต้นทุนน้ำยาแอนติ D ได้ถึง 14,400 บาทต่อปี เมื่อดูผลการทดสอบความไวได้ร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบได้ร้อยละ 100 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ดี

สรุปผลการศึกษา

โดยสรุปจากการศึกษาวิธีการตรวจหาแอนติเจน D ด้วยวิธีสไลด์ทดสอบกับน้ำยาแอนติ D ที่เจือจาง 1:16 อ่านผลด้วยตาเปล่าหลังทำปฏิกิริยาภายใน 2 นาทีและมีการควบคุมคุณภาพด้วยการใช้เซลล์ positive และ negative controls ควบคุมทุกการทดสอบและให้ผลเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานหากต้องการให้ได้ผลครอบคลุมร้อยละ 100 ต้องมีการทดสอบหาค่าการเจือจางของน้ำยาแอนติ D ในแต่ละ lot หรือถ้ามีการเปลี่ยนน้ำยาบริษัทอื่นเพื่อที่น้ำยาแอนติ D มีความสามารถจับแอนติเจน D บนเม็ดเลือดแดงที่มีปริมาณมากน้อยต่างกันและประโยชน์อีกประการหนึ่งของการศึกษานี้คือช่วยลดต้นทุนในการตรวจโดยใช้ น้ำยาแอนติ D เจือจาง 1:16 ได้ถึง 16 เท่า นอกจากนี้วิธีสไลด์เป็นวิธีการทำที่ง่าย รวดเร็ว ตรวจได้ครั้งละจำนวนมากและลดภาระในการล้างหลอดทดลองในปริมาณมากข้อเสียของการตรวจด้วยวิธีสไลด์คือถ้าอ่านผลการจับกลุ่มนานเกิน 2 นาทีอาจทำให้แปลผลผิดพลาดจากสไลด์แห้งนอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์เพื่อลดต้นทุนน้ำยาแอนติชนิดอื่นที่มีราคาแพงและใช้ในการทดสอบตัวอย่างที่มีจำนวนมากเช่น แอนติ E แอนติ c ในการตรวจหาแอนติเจน E แอนติเจน c ในเลือดผู้บริจาค

เอกสารอ้างอิง

1. Fongsarun J, Nuchprayoon I, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood groups in Thai blood donors. Thai J HematoTransfus Med 2002;12:278-86.
2. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. Technical manual. 16th.ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008.
3. Harmening DM. Modern blood banking & transfusion practices. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 2005.
4. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000;95(2): 375-87.
5. Anderson HJ, Patel S. Red cell phenotyping using hexadimethrine bromide (Polybrene) in a microplate system. Transfusion 1984;24(4):353-6.
6. Dixon MR. Microplate: a flexible system for serologic testing. In: Myerds M, Reynolds A, editors. Micro method in blood group serology. Arlington: American Association of Blood Banks, 1984:376-9.
7. อมรรัตน์ ร่มพฤษ, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, ขาววิทย์ ลีลาวัฒน์, มาลินี มีแสง. การดัดแปลงเทคนิคไมโครเพลทเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจน D. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2535;20:123-7.

8. มาลินี มีแสง. การใช้เทคนิคไมโครเพลทตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีโดยใช้แอนติ-ดีเจื้อจางทำปฏิกิริยาในน้ำเกลือปกติ. ศรีนครินทร์เวชสาร 2540;12(4):207-11.
9. พัฒน์ศิริ อังกสิทธิ์, สมเชษฐ์ เดชะพันธ์, ยศธร จงศิริกุล, ปราโมทย์ ศรีวาณิชรักษ์, มานิดา เศรษฐการ, สนิธนาฏ อุทาและคณะ. การตรวจแอนติเจน D ของหมู่เลือดระบบ Rh ด้วยวิธีไมโครเพลท. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2554;21(1):15-21.
10. สหวัฒน์ บัณฑิตรักษ์, บรรณาธิการ. เทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลังเลือด คู่มือปฏิบัติการคลังเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2535.