

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความสัมพันธ์ของผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกกับ autoimmune diseases

ดุชนันท์ ภูริกุล นุชนาฏ เปรมประยูร สารีกา เมฆฉาย และ อุดม ตั้งต้อย

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

บทนำ Direct antiglobulin test (DAT) ใช้ทดสอบหา immunoglobulin และ/หรือ complement ที่จับอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง DAT บวกมีความสัมพันธ์กับ autoimmune diseases แต่ยังไม่ทราบความสัมพันธ์ในผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดี **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกกับ autoimmune diseases **วัสดุและวิธีการ** ตัวอย่างเลือดในน้ำยา EDTA ของผู้บริจาคโลหิต DAT บวก จำนวน 918 ราย นำมาทดสอบซ้ำด้วยน้ำยา polyspecific antihuman globulin (anti-IgG + anti-C3d) ด้วยวิธี conventional tube technique (CTT) และวิธี column agglutination technique (CAT) โดยทำการศึกษาระหว่างปี พ.ศ. 2548-2554 ในรายที่ให้ผลบวกด้วยวิธี CTT จะนัดมาเจาะตรวจซ้ำทุก 3 เดือน จนกว่าผล DAT เป็นลบ จึงกลับมาบริจาคโลหิตได้ รายที่มีผลบวกแรงสม่ำเสมอติดต่อกันอย่างน้อยสองครั้งในระยะเวลา 1 ปี จะนัดมาเจาะเลือดเพื่อนำไปส่งตรวจวินิจฉัย autoimmune diseases ณ หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย **ผลการศึกษา** เลือดผู้บริจาคโลหิต DAT บวก จำนวน 918 ราย ที่นำมาทดสอบซ้ำด้วยวิธี CAT ให้ผลบวก 553 ราย (60.2%) ส่วนวิธี CTT ให้ผลบวก 655 ราย (71.4%) เป็นเพศชาย 213 ราย (32.5%) เพศหญิง 442 ราย (67.5%) ใน 21 ราย (3.2%) ที่ถูกส่งตรวจ autoimmune antibodies พบว่ามี 11 ราย (52.4%) ที่ผลของ autoimmune antibodies ต่างๆ สูงกว่าค่าปกติ ในจำนวนนี้มี 2 ราย (18.2%) ที่มีค่า rheumatoid factor (RF) > 15 IU/mL มี 6 ราย (54.5%) ที่มีค่า antinuclear antibody titer (ANA) > 80 มี 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-thyroglobulin (anti-Tg) > 4.11 IU/mL มี 2 ราย (18.2%) ที่มีค่า anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) > 5.61 IU/mL มี 1 ราย (9.1%) ที่มีค่า anti-thyroid microsomal antibody titer (anti-M Ab titer) > 100 มี 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-cardiolipin IgG positive > 14 GPL/mL มี 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-cardiolipin IgM positive > 10 MPL/mL และมี 2 ราย (18.2%) ที่มีผล VDRL reactive นอกจากนั้นพบว่าผู้บริจาคโลหิตจำนวน 152 ราย (23.2%) มีปัจจัยอื่นๆ ที่น่าจะเป็นสาเหตุของ DAT บวก ได้แก่ ร้อยละ 13.2 มีประวัติการใช้ยา ร้อยละ 3.9 มีประวัติการเป็นโรค และโรคติดเชื้อ ร้อยละ 5.3 มีประวัติภูมิแพ้ และมีผื่นลมพิษ ร้อยละ 6.6 มีประวัติได้รับวัคซีน ร้อยละ 11.8 มีการรับประทานอาหารเสริม ร้อยละ 2.0 มีความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมี และร้อยละ 57.2 มีประวัติการใช้ยาโรค และโรคภูมิแพ้ การได้รับวัคซีน ร่วมกับการรับประทานอาหารเสริม และสมุนไพร รวมทั้งการได้รับสารเคมี **สรุป** แม้ว่าจะไม่ได้มีการกำหนดให้มีการตรวจ DAT ในผู้บริจาคโลหิตทุกราย แต่การตรวจพบ DAT บวก ในผู้บริจาคโลหิตปกติ น่าจะเป็นการชี้บ่งได้ว่าอาจจะมีแนวโน้มในการเกิดโรคทาง autoimmune ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ตัวผู้บริจาคโลหิตเองที่จะได้รับการรักษาตั้งแต่เริ่มต้น อีกทั้งการแจ้งให้ผู้บริจาคโลหิตทราบถึงโรคโลหิตในครั้งถัดไป จนกว่าผลการตรวจเป็นลบ สามารถลดการสูญเสียโลหิตบริจาค และลดต้นทุนของการเตรียมโลหิตและส่วนประกอบโลหิตได้

คำสำคัญ : ● ไคเร็กแอนติโกลบูลินเป็นบวก ● โรคออโตอิมมูน ● โรคเอสแอลอี

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2561;28:415-22.

ได้รับต้นฉบับ 14 กันยายน 2561 แก้ไขบทความ 19 ตุลาคม 2561 รับลงตีพิมพ์ 19 พฤศจิกายน 2561

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางสาวริกา เมฆฉาย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

E-mail: sarika_sa@hotmail.co.th

Original Article

The association of DAT positive blood donors and autoimmune diseases

Dussadee Pooreekul, Nootchanat Premprayoon, Sarika Makechay and Udom Tingtoy

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: The direct antiglobulin test (DAT) is a method used to determine whether red blood cells have been coated in vivo with immunoglobulin, complement, or both. The positive DAT have been associated with autoimmune diseases but unknown in healthy blood donors. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the positive DAT in blood donors that may be associated with autoimmune diseases. **Materials and Methods:** A total of 918 EDTA blood samples collected from DAT positive donors during the year 2005 through 2011 were studied. All samples were repeatedly tested with the conventional tube technique (CTT) and the column agglutination technique (CAT) using polyspecific antiglobulin reagent (anti-IgG + anti-C3d). Blood donors who had a DAT positive result by CTT were repeatedly tested at every 3-month until negative result obtained. Blood donors with consecutively positive DAT at least 2 times in 1 year were sent to the Autoimmune Unit of King Chulalongkorn Memorial Hospital for autoimmune investigation. **Results:** Among blood samples of 918 DAT positive donors, 553 (60.2%) were positive with CAT and 655 (71.4%) were positive with CTT. For the CTT positive, it was found that 213 (32.5%) were male and 442 (67.5%) were female. In the present study, 21 (3.2%) had consecutively positive DAT at least 2 times in 1 year. It was found that 11 (52.4%) of these donors had high level of autoimmune antibodies. There were 2 out of 11 donors (18.2%) had rheumatoid factor (RF) > 15 IU/mL, 6 (54.5%) had antinuclear antibody titer (ANA) > 80, 4 (36.4%) had anti-thyroglobulin (anti-Tg) > 4.11 IU/mL, 2 (18.2%) had anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) > 5.61 IU/mL, 1 (9.1%) had anti-thyroid microsomal antibody titer (anti-M Ab titer) > 100, 4 (36.4%) had anti-cardiolipin IgG positive > 14 GPL/mL, 4 (36.4%) had anti-cardiolipin IgM positive > 10 MPL/mL and 2 (18.2%) VDRL were reactive. Moreover, 152 (23.2%) had various factors which may cause positive DAT such as medication (13.2%), infection (3.9%), allergy (5.3%), vaccinated (6.6%), used of supplementary food (11.8%) and had risk of exposure to chemicals (2.0%). Moreover, 57.2% had history of drugs used in combination with allergy, vaccinations, supplementary food, herbs and chemicals. **Conclusion:** Although DAT is not routinely used in blood donor testing but DAT positive could be detected in normal blood donors which may be associated with autoimmune diseases. Therefore, the finding is useful to the donors itself. In addition, the donors should be asked to refrain from donating until the negative results are obtained in order to reduce blood loss and the cost of blood and blood component preparation.

Keywords : ● Positive DAT ● Autoimmune diseases ● SLE

J Hematol Transfus Med. 2018;28:415-22.

บทนำ

Direct antiglobulin test (DAT) หรือ direct Coombs' test เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จับกับเม็ดเลือดแดงในร่างกายโดยใช้แอนติบอดีชนิด antiglobulin reagent เป็นตัวเชื่อม¹ การทดสอบ DAT ทำได้หลายวิธี เช่น วิธี conventional tube technique (CTT) วิธี column agglutination technique (CAT) และการทดสอบด้วย flow cytometry แต่ที่นิยมใช้ คือ การทดสอบด้วยวิธี CTT และ CAT โดยวิธี CTT เป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายในการสรุปผล โดยใช้ antiglobulin ที่ประกอบด้วย anti-IgG และ anti-C3d ในการทดสอบ ซึ่งสามารถตรวจพบ IgG ได้ 100-500 molecules/red cell และตรวจพบ C3d ได้ 400-1,100 molecules/red cell² DAT ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) และ hemolytic transfusion reactions (HTRs) ในกรณีที่ได้รับเลือดผิดหมู่โดยแอนติบอดีของผู้ป่วยไปจับกับเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคที่ได้รับ ซึ่งใน HTRs พบว่ามี DAT บวกถึงร้อยละ 89³ และ DAT สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย autoimmune hemolytic anemia (AIHA) ทั้งชนิด cold type และ warm type ซึ่ง AIHA ส่วนใหญ่เป็นชนิดไม่ทราบสาเหตุที่เกิดร่วมหรือเป็นภาวะแทรกซ้อนโรคอื่น (secondary AIHA) ได้แก่ systemic lupus erythematosus (SLE) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) sclerosis thyroiditis และโรคเมรังต์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง chronic myeloid leukemia (CML) ที่ได้รับการรักษาด้วย interferon- α รวมทั้งภาวะติดเชื้อต่างๆ ได้แก่ viral infection เช่น HIV mycoplasma hypogammaglobulinemia ovarian tumor และ ulcerative colitis เป็นต้น⁴⁻⁶ นอกจากที่กล่าวมาแล้วนั้น DAT ยังถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัย drug induced immune-mediated hemolysis ซึ่งพบได้ไม่บ่อย แต่มีรายงานว่ามียาหลายชนิดที่ทำให้เกิดภาวะนี้ได้แก่ ยาในกลุ่ม penicillin เช่น penicillin V, amoxicillin, cloxacillin และ dicloxacillin นอกจากนี้ยังสามารถเกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม cephalosporin, macrolide, fluoroquinolone, sulfonamide, tetracycline, quinidine และยาในกลุ่ม chloramphenicol เป็นต้น^{7,8} ในด้านการให้เลือดแก่ผู้ป่วย ธนาคารเลือดจะไม่นำเลือดที่มี DAT บวกไปให้ผู้ป่วย เนื่องจากเมื่อนำไปทำ compatibility test จะให้ผลบวกกับซีรัมของผู้ป่วยทุกราย ซึ่งการมี DAT บวกในเลือดผู้บริจาคส่วนใหญ่นั้นจะไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่ DAT บวกจาก IgG หรือ complement⁹ อีกทั้งการเลือกใช้วิธีที่มี sensitivity ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี CAT ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจจับแอนติบอดีชนิด IgG ได้ดี จึงตรวจพบ DAT

ของผู้บริจาคโลหิตบางรายให้ผลเป็นบวก¹⁰⁻¹² ในผู้บริจาคโลหิตพบ DAT บวกโดยไม่มี hemolysis ได้ 1:1,000 ถึง 1:14,000 ในอเมริกาพบ 1:1,000 ในสหราชอาณาจักร (UK) พบได้ 1:14,000 ส่วนในประเทศกรีซพบได้ 1:3,000 และพบในเพศชายได้มากกว่าเพศหญิงประมาณ 2 เท่า^{9,10,12-17} ส่วนในประเทศไทยพบได้ประมาณ 1:3,000 (personal communication)¹⁸ แม้ว่าการมีภาวะ DAT บวกจะทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นก็ตาม แต่ไม่สามารถนำมาวินิจฉัยโรคได้โดยตรง จำเป็นจะต้องมีข้อมูลอื่นๆ ประกอบ เช่น ประวัติการตั้งครรภ์ ประวัติการรับเลือด การมี autoimmune antibodies ผลการตรวจ CBC รวมทั้งการนำเทคนิคต่างๆ มาช่วยในการวินิจฉัย เช่น elution technique การทดสอบ antibody screening และ antibody identification เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จับอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง เป็นต้น

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีเลือดบริจาคที่มีภาวะ DAT บวก ซึ่งได้รับคินจากโรงพยาบาลต่างๆ เมื่อตรวจซ้ำด้วย monospecific antihuman globulin ชนิด IgG ด้วยวิธี CTT แล้วให้ผลลบ จะส่งเลือดยูนิตนั้นกลับคืนโรงพยาบาล แต่ถ้าให้ผลการตรวจเป็น DAT บวกจะจำหน่ายทิ้ง และนัดผู้บริจาคโลหิตมาเจาะตรวจซ้ำทุกๆ 3 เดือน จนกว่าจะให้ผลลบ อย่างไรก็ตามกรณีที่ผู้บริจาคโลหิตมีผลบวกต่อเนื่องเป็นเวลานาน ซึ่งอาจบ่งบอกถึงการมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเกี่ยวกับ autoimmune ได้แก่ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคเกาต์ systemic lupus erythematosus (SLE) เป็นต้น จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ DAT บวกกับแนวโน้มการมีโรคทาง autoimmune เพื่อให้ผู้บริจาคโลหิตได้ทราบถึงภาวะเสี่ยงนี้ และสามารถดูแลตนเองหรือได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที

วัสดุและวิธีการ

ทำการศึกษาในตัวอย่างโลหิตผู้บริจาคที่มีผล DAT บวก ซึ่งได้รับคินจากโรงพยาบาลต่างๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548-2554 จำนวน 918 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 309 ราย (33.7%) เพศหญิง 609 ราย (66.3%) นำมาทดสอบซ้ำด้วย polyspecific antihuman globulin (anti-IgG + anti-C3d) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics (United Kingdom) โดยวิธี conventional tube technique (CTT)² และทดสอบด้วย column agglutination technique (CAT) ตามคำแนะนำของบริษัท DiaMed Switzerland¹⁹ ตัวอย่างเลือดรายที่ให้ผลบวกนำมาทดสอบด้วย monospecific antihuman globulin (IgG) และ anti-C3d ของบริษัท Ortho Clinical Diagnostics โดยวิธี CTT เมื่อให้ผล DAT เป็นบวกให้ส่งตรวจโลหิต และนัดผู้

บริจาคโลหิตรายนั้นมาเจาะตรวจซ้ำทุก 3 เดือน จนกว่าจะให้ผลลบ จึงยินยอมให้บริจาคโลหิตได้ ส่วนตัวอย่างเลือดรายที่ให้ผลบวก และมีความแรงคงที่ต่อเนื่องอย่างน้อยสองครั้งในระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี ทำการนัดหมายให้ผู้บริจาคโลหิตรายนั้นมาเจาะเลือดเป็น EDTA blood เพื่อส่งตรวจภูมิคุ้มกัน ณ หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และสัมภาษณ์ผู้บริจาคโลหิตเพื่อเก็บข้อมูลประวัติการรับประทานยา อาหารเสริม การรับวัคซีน ประวัติการเป็นโรค และการรับประทานยาต่างๆ รวมทั้งเก็บข้อมูลประวัติผู้บริจาคโลหิต ได้แก่ อายุ เพศ จำนวนครั้งในการบริจาคโลหิต ตลอดจนรายละเอียดการบริจาคโลหิตจากโปรแกรมทะเบียนผู้บริจาคโลหิต บันทึกผลการตรวจ และข้อมูลผู้บริจาคโลหิต ลงในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Office Excel 2007 จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้ค่าสถิติ descriptive statistics ได้แก่ ร้อยละ (percentage)

ผลการศึกษา

ผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกจำนวน 918 ราย ที่ได้รับคินมา จากโรงพยาบาลต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบซ้ำ พบว่าให้ผลบวกด้วยวิธี CTT จำนวน 655 ราย (71.4%) และให้ผลบวกด้วยวิธี CAT จำนวน 553 ราย (60.2%) ส่วนที่ให้ผลลบ พบว่ามีจำนวน 263 ราย (28.6%) ให้ผลลบด้วยวิธี CTT และมีอีก 365 ราย (39.8%) ให้ผลลบด้วยวิธี CAT ตามลำดับ (Table 1) โดยจำนวน 655 ราย ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี CTT แบ่งเป็นเพศชาย 213 ราย (32.5%) เพศหญิง 442 ราย (67.5%) ในจำนวนที่ให้ผลบวกด้วยวิธี CTT มี 21 ราย (3.2%) ที่เข้ารับการตรวจวินิจฉัยทางด้าน autoimmune diseases พบว่ามี 10 ราย (47.6%) ที่มีค่า autoimmune antibodies ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติ และมี 11 ราย (52.4%) ที่ผลของ autoimmune antibodies ต่างๆ สูงกว่าค่าปกติ (Table 2) โดยมีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 2 ราย (18.2%) ที่มีค่า rheumatoid factor (RF) > 15 IU/mL ได้แก่ รายที่ 4 และรายที่ 5 โดยมีค่าเท่ากับ 20.7 และ 64.6 IU/mL ตามลำดับ มีจำนวน 6 ราย (54.5%) ที่มีค่า antinuclear antibody titer (ANA) > 80 โดยรายที่ 10 มีค่าสูงสุด ($\geq 2,560$) รองลงมา คือ รายที่ 9 ($\geq 1,280$) รายที่ 7 (1,280) รายที่ 11 (320)

ส่วนรายที่ 2 และรายที่ 3 มีค่าเท่ากับ 160 มีจำนวน 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-thyroglobulin (anti-Tg) > 4.11 IU/mL ได้แก่ รายที่ 7, 8, 9 และรายที่ 11 โดยมีค่าเท่ากับ 40, 69.59, 395.06 และ 366.92 IU/mL ตามลำดับ มีจำนวน 2 ราย (18.2%) ที่มีค่า anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) > 5.61 IU/mL ได้แก่ รายที่ 7 และรายที่ 9 โดยมีค่าเท่ากับ 100 และ 329.78 IU/mL ตามลำดับ มีจำนวน 1 ราย (9.1%) ที่มีค่า anti-thyroid microsomal antibody titer (anti-M Ab titer) > 100 ได้แก่ รายที่ 3 โดยมีค่าเท่ากับ 400 มีจำนวน 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-cardiolipin IgG positive > 14 GPL/mL ได้แก่ รายที่ 1, 2, 6 และรายที่ 10 โดยมีค่าเท่ากับ ≥ 91 , 19.1, 61.3 และ 27.9 GPL/mL ตามลำดับ มีจำนวน 4 ราย (36.4%) ที่มีค่า anti-cardiolipin IgM positive > 10 MPL/mL ได้แก่ รายที่ 1, 2, 7 และรายที่ 10 โดยมีค่าเท่ากับ 44.5, 13.9, 13.9 และ 18.2 MPL/mL ตามลำดับ และมีจำนวน 2 ราย (18.2%) ได้แก่ รายที่ 2 และรายที่ 7 ที่มีผล VDRL reactive ผู้บริจาคโลหิตจำนวน 655 ราย ที่มี DAT บวกด้วยวิธี CTT พบว่า 152 ราย (23.2%) มีปัจจัยอื่นที่ไม่ใช่จาก IgG และ complement โดย 20/152 ราย (13.2%) มีประวัติการใช้ยา 6/152 ราย (3.9%) มีประวัติการเป็นโรค และโรคติดเชื้อ 8/152 ราย (5.3%) มีประวัติภูมิแพ้ และผื่นลมพิษ 10/152 ราย (6.6%) มีประวัติการได้รับวัคซีน 18/152 ราย (11.8%) มีการรับประทานยาเสริมยี่ห้อต่างๆ ที่วางจำหน่ายอยู่ ณ ปัจจุบัน 3/152 ราย (2.0%) มีความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมี และ 87/152 ราย (57.2%) มีประวัติการใช้ยาร่วมกับปัจจัยอื่นๆ

วิจารณ์

จากการศึกษาเมื่อนำเลือดผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกจำนวน 918 ราย ที่ได้รับคินมาจากโรงพยาบาลต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบซ้ำด้วยวิธี CTT และวิธี CAT พบว่าวิธี CTT ให้ผลบวกร้อยละ 71.4 และให้ผลลบน้อยลง 28.6 ส่วนวิธี CAT ให้ผลบวกร้อยละ 60.2 และให้ผลลบน้อยลง 39.8 ซึ่งแตกต่างจากที่ทดสอบโดยโรงพยาบาล อาจเป็นเพราะโรงพยาบาลต่างๆ ที่ส่งคินเลือด DAT บวก อาจใช้เครื่องมือในการทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะ

Table 1 The characteristics of blood donors with a positive DAT

DAT positive donors		N (%)	DAT with CTT, N (%)		DAT with CAT, N (%)	
			Positive	Negative	Positive	Negative
Sex	Male	309 (33.7)	213 (32.5)	96 (36.5)	171 (30.9)	138 (37.8)
	Female	609 (66.3)	442 (67.5)	167 (63.5)	382 (69.1)	227 (62.2)
Total		918 (100)	655 (71.4)	263 (28.6)	553 (60.2)	365 (39.8)

DAT = direct antiglobulin test; CTT = conventional tube technique; CAT = column agglutination test

Table 2 The results of autoimmune antibodies in 11 blood donors with positive DAT

Autoimmune antibodies	DAT positive donors											Reference range
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Rheumatoid factor (RF)	< 10.2	< 9.5	< 10.2	20.7	64.6	< 10.2	< 9.5	< 8.69	< 8.69	< 9.44	< 8.69	< 15 (IU/mL)
Antinuclear antibody titer (ANA)	< 40	160	160	< 40	< 40	< 40	1,280	< 80	≥ 1,280	≥ 2,560	320	Titer < 80
Anti-thyroglobulin (anti-Tg) (by CMIA)	-	-	-	-	-	-	40	69.59	395.06	1.33	366.92	< 4.11 (IU/mL)
Anti-thyroglobulin titer	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	-	-	-	-	-	< 20 (IU/mL)
Anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) (by CMIA)	-	-	-	-	-	-	100	1.57	329.78	0.43	4.29	< 5.61 (IU/mL)
Anti-thyroid microsomal antibody titer (anti-M Ab titer)	< 100	< 100	400	< 100	< 100	100	-	-	-	-	-	Titer < 100
Anti-cardiolipin IgG (by ELISA)	≥ 91	19.1	< 10	< 10	< 10	61.3	13.4	12.1	< 10	27.9	< 10	Positive > 14 (GPL/mL)
Anti-cardiolipin IgM (by ELISA)	44.5	13.9	< 7	< 7	< 7	9.2	13.9	< 7	< 7	18.2	< 7	Positive > 10 (MPL/mL)
VDRL	Non-reactive	Weakly reactive	Non-reactive	Non-reactive	Non-reactive	Non-reactive	Weakly reactive	Non-reactive	Non-reactive	Non-reactive	Non-reactive	Non-reactive

ใช้วิธี CAT ที่ใช้ gel หรือ glass beads มาจับ agglutinated RBC มี sensitivity ในการตรวจจับ antibody (IgG) สูงเกินไป จึงตรวจพบ DAT ของผู้บริจาคโลหิตบางรายเป็นผลบวกได้ มีการศึกษาพบว่าวิธี CAT มี sensitivity ดีกว่าวิธี CTT ในการตรวจพบเม็ดเลือดแดงที่ถูกจับด้วย antibody (IgG)^{20,21} แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มี sensitivity ต่ำกว่าวิธี CTT ในการตรวจจับเม็ดเลือดแดงที่ถูกจับด้วย complement (C3d)²² อาจทำให้การศึกษานี้ตรวจพบ DAT บวกด้วยวิธี CTT มากกว่าวิธี CAT

ในผู้บริจาคโลหิต DAT บวกจำนวน 11 ราย ที่มี markers ของโรค autoimmune ผิดปกติ พบเป็นเพศหญิงจำนวน 8 ราย (72.7%) และเพศชายจำนวน 3 ราย (27.3%) ผู้บริจาคโลหิตที่มี factors ต่างๆ เกินค่าปกติ ได้แก่ ค่า rheumatoid factor (RF) ที่เกินกว่ามาตรฐาน (< 15 IU/mL) พบในรายที่ 4 และรายที่ 5 โดยมีค่าเท่ากับ 20.7 และ 64.6 IU/mL ตามลำดับ ซึ่งการมีค่า RF ในระดับสูงๆ พบว่าร้อยละ 40-70 มักเป็นข้อชี้บ่งว่ามีการอักเสบของโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือโรคเกาต์ โดยทั้งสองราย มีอาการแสดงของโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ นอกจากนี้ค่า RF ยังถูกใช้ในการประเมินอาการของโรคทาง autoimmune เช่น systemic lupus erythematosus (SLE) ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ อีกกว่า 10 รายการ อย่างไรก็ตามการที่ค่า RF ให้ผลบวกสามารถพบได้ในภาวะอื่นๆ เช่น ในผู้สูงอายุ โรค connective tissue ชนิดอื่นๆ เช่น โรค SLE และ scleroderma โรคที่เกิดจากภาวะติดเชื้อเรื้อรังทั้งจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส หรือ โปรโตซัว เช่น วัณโรค โรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัส โรคมะเร็งต่างๆ ได้แก่ multiple myeloma และ leukemia เป็นต้น ซึ่งในภาวะเหล่านี้ค่า RF ที่ให้ผลบวกมักจะมี titer ต่ำๆ²³ ผู้บริจาคโลหิตทั้ง 11 ราย ถูกส่งตรวจค่า antinuclear antibody titer (ANA) ซึ่งเป็นการตรวจคัดกรองในการวินิจฉัยว่าอาจมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรค SLE เช่น การศึกษานี้พบว่ามีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 3 ราย ได้แก่ รายที่ 7, 9 และรายที่ 10 มีอาการของโรค SLE ได้แก่ มีไข้ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดบวมตามข้อ ขาบวม ผิวน้ำตาลเข้มแดง และมีผื่นแดงตามใบหน้า รวมทั้งมีค่า ANA สูงกว่าปกติ คือ ผู้บริจาคโลหิตรายที่ 10 มีค่า ANA ≥ 2,560 รองลงมา คือ รายที่ 9 และรายที่ 7 โดยมีค่าเท่ากับ ≥ 1,280 และ 1,280 ตามลำดับ อีก 3 ราย พบว่ารายที่ 11 มีค่า 320 ส่วนรายที่ 2 และรายที่ 3 มีค่าเท่ากับ 160 ได้มีการประมาณการว่าค่า ANA ที่ > 320 จะสัมพันธ์กับการเป็นโรค SLE ได้ถึงร้อยละ 80 แต่ค่า ANA เพียงอย่างเดียวไม่สามารถวินิจฉัยโรค SLE ได้ จำเป็นต้องอาศัยอาการแสดงออกทางร่างกายรวมทั้งผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ได้แก่ anti-dsDNA anti-Sm anti-cardiolipin antibodies

และ lupus anticoagulant เป็นต้น²⁴ ผู้ที่มี anti-thyroglobulin (anti-Tg) ระดับสูงๆ ได้แก่ รายที่ 9 และรายที่ 11 โดยมีค่าเท่ากับ 395.06 และ 366.92 IU/mL ตามลำดับ ซึ่งเกินกว่าค่าปกติ (< 4.11 IU/mL) อยู่หลายเท่า การมีค่า anti-Tg สูงๆ จะบ่งบอกถึงภาวะที่มีการอักเสบของต่อมไทรอยด์ เนื่องจาก anti-Tg เป็นตัวชี้บ่งถึงการมีหรือไม่มีโรค²⁵⁻³⁰ ทั้งรายที่ 9 ยังมีค่า ANA $\geq 1,280$ และ anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) เท่ากับ 329.78 IU/mL ซึ่งสูงกว่าค่าปกติเช่นกัน ซึ่งเป็นข้อสนับสนุนว่ามีแนวโน้มของการมี autoimmune thyroid diseases นอกจากนี้ค่า anti-Tg และ ANA ในคนปกติส่วนใหญ่พบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย และพบในผู้สูงอายุมากกว่าคนหนุ่มสาว โดยเฉพาะผู้ที่มีโรคเรื้อรัง³¹ เช่นเดียวกับการศึกษาที่พบค่า anti-Tg และ ANA ที่สูงเกินค่าปกติในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย โดยพบได้ร้อยละ 75 (3/4 ราย) และร้อยละ 83.3 (5/6 ราย) ตามลำดับ

มีผู้บริจาคโลหิตจำนวน 5 ราย (รายที่ 7-11) ได้รับการตรวจ anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) พบว่ามี 2 ราย ที่มีค่า anti-TPO สูงกว่าค่ามาตรฐาน (< 5.61 IU/mL) คือ รายที่ 7 และรายที่ 9 โดยมีค่าเท่ากับ 100 และ 329.78 IU/mL ตามลำดับ ซึ่ง TPO เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นที่สุดในการสร้าง thyroid hormones และมีความสัมพันธ์กับ thyroid-microsomal autoantibodies ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวินิจฉัย autoimmune thyroid diseases และใช้ประเมิน clinical course³¹ แต่การศึกษานี้แพทย์ได้เลือกส่งตรวจเพียง anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) หรือ anti-thyroid microsomal antibody titer (anti-M Ab titer) ตัวใดตัวหนึ่ง จึงไม่สามารถสนับสนุนความสัมพันธ์ของทั้งสองค่าได้ มีผู้บริจาคโลหิตรายที่ 1-6 ได้รับการตรวจ anti-M Ab titer พบว่ารายที่ 3 มีค่าเท่ากับ 400 ซึ่งเกินค่าปกติ (< 100) หลายเท่าตัว และการมีค่า anti-M Ab titer สูงๆ พบว่าจะสัมพันธ์กับ Hashimoto's disease ได้ ร้อยละ 90-100 และร้อยละ 50-80 จะสัมพันธ์กับ Graves' disease ส่วนร้อยละ 40 จะสัมพันธ์กับ autoimmune diseases ชนิดอื่นๆ ส่วน anti-cardiolipin เป็น antiphospholipid antibodies ปกติพบได้ในผู้ที่มีการติดเชื้อ เช่น HIV/AIDS มะเร็งบางชนิด การได้รับยาบางชนิด เช่น phenytoin penicillin ตลอดจนพบได้ในผู้สูงอายุถึงแม้จะไม่มีอาการแสดงก็ตาม³² ผู้บริจาคโลหิตจำนวน 2 ราย (รายที่ 2 และรายที่ 7) ให้ผล VDRL reactive โดยมีผลเป็น weakly reactive และยังพบว่ามีค่า anti-cardiolipin antibodies IgM และ IgG positive ด้วย การมีผล false positive syphilis มักจะตรวจพบ antiphospholipid antibodies lupus anticoagulant และ anti-cardiolipin antibodies ร่วมด้วย ซึ่งการตรวจพบ

anti-cardiolipin ชนิด IgM ที่ระดับสูงๆ จะมีความสัมพันธ์กับ autoimmune hemolytic anemia ในสภาวะที่มีแอนติบอดีจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง³³ anti-cardiolipin ทั้งชนิด IgM/IgG ใช้ในการวินิจฉัยโรค antiphospholipid syndrome (APS) ซึ่งเป็นโรค autoimmune disorder โดยจะพบ thrombosis และมี complications ของการตั้งครรภ์ร่วมกับมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการผิดปกติ แต่ anti-cardiolipin ชนิด IgM ที่มากกว่า 40 MPL/mL หรือ anti-cardiolipin ชนิด IgG ที่มากกว่า 40 GPL/mL ในการวินิจฉัยโรค APS ต้องตรวจพบได้อย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 12 สัปดาห์ และจะต้องพบร่วมกับ IgA isotype³⁴ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัย DAT บวกในผู้บริจาคโลหิตทั้ง 11 ราย ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้องค์ประกอบหลายอย่างในการตัดสินใจ เช่น ประวัติการรักษาด้วยยา ประวัติการได้รับเลือด ประวัติการตั้งครรภ์ การแท้งบุตร การมี hemolysis ในร่างกาย เป็นต้น

การศึกษานี้พบว่าผู้บริจาคโลหิตจำนวนมากที่มีผล DAT บวกและลบไม่สม่ำเสมอ จากผลการเก็บรวบรวมข้อมูล พบว่ามีจำนวน 152 ราย (23.2%) ที่มี DAT บวก ซึ่งสาเหตุไม่ได้เกิดจาก IgG หรือ complement แต่อาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน จากข้อมูลที่ได้จากการสัมภาษณ์และซักประวัติ สามารถจำแนกได้ดังนี้ พบผู้บริจาคโลหิตจำนวน 20 ราย (13.2%) มีประวัติการใช้ยาเป็นประจำซึ่งยาส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม penicillin, analgesics, NSAID ยารักษาโรคเกาต์ ยาต้านไวรัส และ amoxicillin ยารักษาไมเกรน ยาคุมกำเนิด ยาลดความอ้วน ยาความดัน เบาหวานตลอดจนยากกระตุ้นทางเพศ พบ 6 ราย (3.9%) มีประวัติการเป็นโรคและโรคติดเชื้อ ได้แก่ โรคต่อมไทรอยด์ ความดัน เบาหวาน SLE รูมาตอยด์ ไมเกรน มีประวัติเป็นลมชัก วัณโรค ไวรัสตับอักเสบบี และงูสวัด รวมทั้งพบผู้บริจาคโลหิต 1 ใน 6 ราย พบมีการติดเชื้อ HIV ในการมาบริจาคโลหิตครั้งสุดท้าย พบ 8 ราย (5.3%) มีประวัติภูมิแพ้ และมีผื่นลมพิษ พบ 10 ราย (6.6%) มีประวัติการได้รับวัคซีน ได้แก่ วัคซีนป้องกันบาดทะยัก ไขหวัดใหญ่ ไขหวัด 2009 และเชรุ่มแก้พิษงู เป็นต้น พบ 18 ราย (11.8%) มีการรับประทานอาหารเสริมยี่ห้อต่างๆ ที่วางจำหน่ายอยู่ ณ ปัจจุบัน พบ 3 ราย (2.0%) ได้รับสารตะกั่วและสัมผัสสารเคมีจากการทำงานในโรงงานฟนักรยยนต์ และโรงงานผลิตรองเท้า และ 87 ราย (57.2%) ที่พบว่ามียาหลายอย่างประกอบกัน ได้แก่ มีประวัติการใช้ยาร่วมกับการได้รับวัคซีน การรับประทานอาหารเสริมและสมุนไพรต่างๆ ได้แก่ ขมิ้นชัน กระชายดำ ใบบัวบก มะขามแขก พริกไทยดำ มะรุม กล้วยข้าวสาลี เปะก๊วย ฟ้าทะลายโจร ชาอู่หลง ยาลูกกลอน และสมุนไพรจีน เป็นต้น สิ่งเหล่านี้อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะ

DAT บวกในผู้บริจาคโลหิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีแอนติบอดีต่อยาประเภท penicillin^{7,8} และ complement หลังการใช้ยา quinidine ตลอดจนการมีโปรตีนบางชนิดจับที่ผิวเม็ดเลือดแดงที่ผิดปกติหลังการใช้ยา cephalosporins การได้รับ intravenous gammaglobulin ขนาดสูง (1 กรัม/กิโลกรัม/วัน นาน 5 วัน)³⁵ นอกจากนี้ยังสามารถพบ DAT บวกได้ในรายที่กำลังติดเชื้อไวรัส³⁶

ในด้านการจัดหาโลหิต ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จะนำโลหิตบริจาคที่มีผล DAT บวกที่ได้รับคืนจากโรงพยาบาลต่างๆ มาทดสอบซ้ำด้วย monospecific antiglobulin (IgG) อย่างน้อย 2 บริษัท ด้วยวิธี CTT ในกรณีที่ให้ผล DAT บวกจะแจ้งให้ผู้บริจาคโลหิตรายนั้นงดบริจาคในครั้งถัดไป และนัดหมายมาเจาะตรวจซ้ำทุกๆ 1 ปี ส่วนโลหิตบริจาคที่ให้ผลลบจะนำส่งคืนโรงพยาบาลเพื่อนำไปใช้ ดังนั้นในการนำโลหิตเหล่านี้ไปใช้ในขั้นตอนการทำ antiglobulin test เช่น crossmatching จำเป็นต้องใช้ monospecific antiglobulin (IgG) ในการทดสอบ

สรุป

แม้ว่าจะไม่ได้มีการกำหนดให้มีการตรวจ DAT ในผู้บริจาคโลหิตทุกราย แต่การตรวจพบ DAT บวกติดต่อกันเป็นเวลานานในผู้บริจาคโลหิตปกติ น่าจะเป็นการชี้บ่งได้ว่าอาจจะมีแนวโน้มในการเกิดโรคทาง autoimmune ซึ่งอาจจะแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการก็ตาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ SLE โรคกระเพาะ และโรคติดเชื้อต่างๆ ดังนั้นการพิจารณาให้มีการตรวจติดตามผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกทุกราย น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานบริการโลหิต โดยการแจ้งให้ผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกทราบถึงความสำคัญของภาวะ DAT บวก และความสัมพันธ์กับโรคที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น จะเป็นประโยชน์แก่ตัวผู้บริจาคโลหิตเองที่จะได้รับการรักษาตั้งแต่เริ่มต้น อีกทั้งการแจ้งให้ผู้บริจาคโลหิตในครั้งถัดไปจนกว่าผลการตรวจเป็นลบ สามารถลดการสูญเสียโลหิตบริจาค และลดต้นทุนของการเตรียมโลหิตและส่วนประกอบโลหิตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ที่ปรึกษาศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้ความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเตรียมต้นฉบับ และขอขอบคุณคุณทัศนีย์ สกุดดำรงพาณิชย์ อดีตรองผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่เป็นผู้ริเริ่มศึกษาภาวะ DAT บวกในผู้บริจาคโลหิต ตลอดจนแพทย์ และเจ้าหน้าที่หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในการตรวจโลหิต

พร้อมทั้งให้คำแนะนำแก่ผู้บริจาคโลหิต และขอขอบคุณ นาวาโทหญิง แพทย์หญิงอุบลวัฒน์ จรูญเรืองฤทธิ์ ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยนี้

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รหัสโครงการที่ 1/2560

เอกสารอ้างอิง

1. Coombs RR, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol.* 1945;26:255-66.
2. Method 3-6 Performing a direct antiglobulin test. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. *Technical manual.* 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008:908-9.
3. Pineda AA, Brzica SM Jr, Taswell HF. Hemolytic transfusion reaction. Recent experience in a large blood bank. *Mayo Clin Proc.* 1978;53:378-90.
4. Solol-Celigny P, Vazeux R, Vroclans M, Amar M, Herrera A, Bernard JF, et al. Positive Coombs test in acute leukaemia. *Br J Haematol.* 1984;57:563-9.
5. Steegmann JL, Pinilla I, Requena MJ, de la Cámara R, Granados E, Fernández Villalta MJ, et al. The direct antiglobulin test is frequently positive in chronic myeloid leukemia patients treated with interferon-alpha. *Transfusion.* 1997;37:446-7.
6. Jäger U, Lechner K. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman R, Benz E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, editors. *Hematology: basic principles and practice.* 6th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2013:614-27.
7. Garratty G. Review: drug-induced immune hemolytic anemia--the last decade. *Immunohematology.* 2004;20:138-46.
8. Pierce A, Nester T. Pathology consultation on drug-induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:7-12.
9. Mougey R, Martin J. Positive direct antiglobulin tests in stored donor samples: an avoidable cause of discarded units. *Transfusion.* 1986;26:550.
10. Bellia M, Georgopoulos J, Tseveren V, Nomikou E, Vgontza N, Kontopoulou-Griva I. The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors. *Immunohematology.* 2002;18:78-81.
11. Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol.* 2012;87:707-9.
12. Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, Stratton F. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. *Vox Sang.* 1980;38:99-105.
13. Worledge SM. The interpretation of a positive direct antiglobulin test. *Br J Haematol.* 1978;39:157-62.
14. Judd WJ, Barnes BA, Steiner EA, Oberman HA, Averill DB,

- Butch SH. The evaluation of a positive direct antiglobulin test (autocontrol) in pretransfusion testing revisited. *Transfusion*. 1986;26:220-4.
15. Stratton F, Rawlinson VI, Merry AH, Thomson EE. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. II. *Clin Lab Haematol*. 1983;5:17-21.
 16. Mehta K, Taylor H, Holland B. Positive direct antihuman globulin test in normal blood donors. *N J Med*. 1987;84:265-7.
 17. Bareford D, Longster G, Gilks L, Tovey LA. Follow-up of normal individuals with a positive antiglobulin test. *Scand J Haematol*. 1985;35:348-53.
 18. Chiewsilp P. Clinical use of direct antiglobulin test. *J Hematol Transfus Med*. 2011;21:3-4.
 19. DiaMed-ID Microtyping System, Direction for use, DiaMed AG, Switzerland. 1991.
 20. Dittmar K, Procter JL, Cipolone K, Njoroge JM, Miller J, Stroncek DF. Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusion*. 2001;41:1258-62.
 21. Nathalang O, Chuansumrit A, Prayoonwivat W, Siripoonya P, Sriphaisal T. Comparison between the conventional tube technique and the gel technique in direct antiglobulin test. *Vox Sang*. 1997;72:169-71.
 22. Tissot JD, Kiener C, Burnand B, Schneider P. The direct antiglobulin test: still a place for the tube technique? *Vox Sang*. 1999;77:223-6.
 23. Thai Rheumatism Association. Practice guidelines for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. Bangkok: Thai Rheumatism Association; 2014:1-56.
 24. Notman DD, Kurata N, Tan EM. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med*. 1975;83:464-9.
 25. Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. National Academy of Clinical Biochemistry - Professional Association [Internet]. 2002 [cited 2018 Jan 10]. Available from: <file:///C:/Users/user/Downloads/ThyroidArchived2010.pdf>.
 26. Kumar A, Shah DH, Shrihari U, Dandekar SR, Vijayan U, Sharma SM. Significance of antithyroglobulin autoantibodies in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid*. 1994;4:199-202.
 27. Pacini F, Mariotti S, Formica N, Elisei R, Anelli S, Capotorti E, et al. Thyroid autoantibodies in thyroid cancer: incidence and relationship with tumour outcome. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1988;119:373-80.
 28. Rubello D, Casara D, Girelli ME, Piccolo M, Busnardo B. Clinical meaning of circulating antithyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer: a prospective study. *J Nucl Med*. 1992;33:1478-80.
 29. Chiovato L, Latrofa F, Braverman LE, Pacini F, Capezzone M, Masserini L, et al. Disappearance of humoral thyroid autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. *Ann Intern Med*. 2003;139:346-51.
 30. Kandi S, Rao P. Anti-thyroid peroxidase antibodies: Its effect on thyroid gland and breast tissue. Editorial commentary. *Ann Trop Med Public Health*. 2012;5:1-2.
 31. The University of Iowa Department of Pathology Laboratory services handbook, Thyroglobulin Antibodies (Autoimmune Thyroiditis) [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 10]. Available from: http://www.healthcare.uiowa.edu/path_handbook/handbook/test2355.html
 32. Antiphospholipid Antibodies. Johns Hopkins Lupus Center. Available from: <https://www.hopkinslupus.org/lupus-tests/antiphospholipid-antibodies/>.
 33. MCLIP - Clinical: Phospholipid (Cardiolipin) Antibodies, IgM, Serum. Available from: <https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/81900>.
 34. Shin YC. Anticardiolipin Antibody: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels [Internet]. 2013 Apr [cited 2018 Jan 10]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/2084956-overview>.
 35. Majer RV, Hyde RD. High-dose intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol*. 1988;10:391-5.
 36. Lai M, d'Onofrio G, Visconti E, Tamburrini E, Cauda R, Leone G. Aetiological factors related to a positive direct antiglobulin test result in human immunodeficiency virus-infected patients. *Vox Sang*. 2006;90:325-30.