

นิพนธ์ต้นฉบับ

Titer และ Specificity ของ Normal Cold Agglutinin

ทิภาพรณ นิตยะ, อัญชลี ศุภนิตย์, ปองจิต เข้มนาถ, นริสา เก่งตรง

งานธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี

บทคัดย่อ : Normal cold agglutinin (CA) เป็นแอนติบอดีที่พบในซีรัมของคนปกติทั่วไป สามารถทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงของตนเองที่ 4 °C. ที่ระดับ titer ต่ำๆ ในกรณีที่พบในช่วงอุณหภูมิสูงขึ้น หรือ titer สูงๆ อาจทำให้เกิดพยาธิสภาพ หรืออาจรบกวนการทดสอบ routine cell และ serum test

จากการศึกษาระดับ titer และ specificity ของ CA ของคนทั่วไป จำนวน 200 ราย เป็นผู้บริจาคโลหิต 100 ราย และผู้ป่วยนอกที่มาตรวจรักษาที่โรงพยาบาลราชวิถี จำนวน 100 ราย เป็นชาย 103 ราย และหญิง 97 ราย มีอายุระหว่าง 11-79 ปี พบว่า ไม่มี CA (negative) 23 ราย มี CA titer 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 และ 128 เป็นจำนวน 41, 41, 31, 39, 18, 2, 4 และ 1 ราย ตามลำดับ ชนิดของแอนติบอดีเป็น anti - I, anti - i และ anti - H จำนวน 173, 2 และ 2 รายตามลำดับ ไม่พบ anti - Pr และทุกรายเป็น IgM โดยถูก inactivated ด้วย dithiothreitol (DTT)

Key Words: ● Cold agglutinin ● Anti-I ● Anti-i ● Anti-H

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2541;8:19-24.

ในซีรัมของคนปกติโดยทั่วไป จะพบ auto antibody ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ สามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงตนเองที่อุณหภูมิต่ำๆ ซึ่งมักเป็น Ig M¹ และมักมี specificity กับ red cell antigen I^{2,3} และถ้ามี Ab ในปริมาณ titer สูงๆ ก็อาจมีผลรบกวนต่อการทดสอบต่างๆ ไป เช่น ABO grouping, Rh typing หรือ cross-matching⁴ นอกจากนี้ ถ้า Ab นี้ทำปฏิกิริยาในอุณหภูมิที่กว้างขึ้นก็อาจพบในผู้ป่วย AIHA ได้^{5,6}

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาถึงระดับ titer และ specificity ของ normal cold agglutinin (CA) ตลอดจน ชนิดของ CA ในคนทั่วไป โดยศึกษาจากผู้บริจาคโลหิต และเพื่อให้ได้กลุ่มคนที่มีความอายุกว้างขึ้น

จึงศึกษาในผู้ป่วยนอกที่มารับการรักษาพยาบาล ที่ รพ. ราชวิถี และไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคทางโลหิตวิทยา

วัสดุและวิธีการ

ซีรัมที่ได้จากผู้บริจาคโลหิตของ รพ.ราชวิถี 100 ราย และผู้ป่วยนอกที่มาตรวจที่ รพ.ราชวิถี และไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคทางโลหิตวิทยาจำนวน 100 ราย โดยเก็บเลือดตัวอย่าง เป็น clotted blood นำไปแช่ทันทีที่ water bath 37 °C 30 นาที ปั่นแยกซีรัมนำมาทดสอบ titration ในวันนั้น ในกรณีที่เก็บไว้ทดสอบเก็บที่ -20 °C⁷

Cold hemagglutination titers วิธี tube test ทดสอบ โดยทำ serial dilution serum ด้วย NSS เปลี่ยน pipette tip ทุก dilution ใช้ diluted serum แต่ละ dilution 3 หยด เติม 1 หยด 2-5 % ของ auto cell และ OI cell วางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นอ่าน

ได้รับต้นฉบับเมื่อ พฤษภาคม 2541และให้ตีพิมพ์เมื่อ มิถุนายน 2541
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ คุณทิภาพรณ นิตยะ งานธนาคารเลือด
กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

ผล agglutinate ต่อจากนั้นวางที่ 4°C 2 ชั่วโมง และ overnight (18-24 ชั่วโมง) อ่านผล agglutinate โดยไม่ปั่น⁷

Test red cells ใช้ 2-5% cell

- OI ใช้ adult cell หมู่ O 2 คน I positive cell โดยใช้ cell ชุดเดียวกับที่ทำ routine screening cell

- Autologous red cell ของแต่ละเลือดตัวอย่าง
- O cord blood
- Oh
- Enzyme treated red cell ใช้ packed cell OI incubate กับ 1% papain 1/9 (v/v) 37°C 30 นาที ล้าง 3 ครั้งด้วย NSS เตรียม 2% cell (1% papain เตรียมใน phosphate buffer pH 7.2)⁸

Specificity ทดสอบโดยใช้ serum 2 หยดเติม 1 หยด 2-5% cell ของ auto cell, OI, O cord, Oh และ papainized red cell 4°C overnight อ่านผล agglutinate โดยไม่ปั่น แปลผลตามตารางที่ 1

ชนิดของ antibody หาโดย incubate equal volume ของ 0.01M Dithiothreitol (DTT) และ test serum 37°C 30 นาที Control ใช้ equal volume ของ phosphate buffer saline และ test serum หลัง incubate เติม cell ที่ใช้ทดสอบทั้ง DTT treated

serum และ control serum incubate 4°C overnight อ่านผล agglutinate โดยไม่ปั่น¹⁰ 0.01 M DTT (Sigma Chemical Company) เตรียมใน phosphate buffer saline, pH 7.4 แบ่งเป็น aliquot เก็บ -20°C และละลายในวันที่ใช้ทดสอบ

ผลการศึกษา

ซีรัมทั้งหมด 200 ราย เป็นผู้บริจาคโลหิตที่ รพ. ราชวิถี 100 ราย ผู้ป่วยนอกที่มารับการรักษาที่ รพ.ราชวิถี และไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคทางโลหิตวิทยาจำนวน 100 รายเป็นชาย 103 ราย หญิง 97 ราย อายุ 11 - 79 ปี เฉลี่ย 39 + 15 ปี ดังแสดงตามตารางที่ 2 พบว่าไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ CA titer ระหว่างกลุ่มผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย (p > 0.05) และ ระหว่างเพศหญิงและเพศชาย (p > 0.05)

ตารางที่ 3 แสดงถึง CA titer range เมื่อใช้ auto cell และ O cell ทำปฏิกิริยาที่ 4°C 2 ชั่วโมง และ overnight แสดงค่า mean เป็น Geometric Mean Titer (GMT) ค่า titer ที่ 2 ชั่วโมงของ auto cell และ O cell จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p > 0.05) แต่เมื่อ overnight ค่า titer ต่อ auto cell จะสูงกว่า titer ต่อ O cell อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) เมื่อ incubation time นานขึ้น (overnight) ค่า titer จะสูงกว่าค่า titer ที่ 2

ตารางที่ 1 Specificity of cold agglutinins

Antibody Specificity	Test Red Cells				References
	OI	OI (enz.treated)	Oi (cord)	Oh	
anti - I	+	+	±	+	7
anti - i	-	-	+	-	7
anti - H	+	+	+	-	7
anti - Pr	+	-	±	+	8, 9

ตารางที่ 2 Cold agglutinin titers according to type of sample and sex

		Number	Age (years)			CA Titer*	
			Range	Mean	SD	Range	Mean**
Type of Sample	Total	200	11 - 79	39	15	0 - 128	3.17
	Donor	100	17 - 59	33	10	0 - 128	4.00
	Patient	100	11 - 79	46	15	0 - 64	2.50
Sex	Male	103	17 - 78	38	14	0 - 128	3.20
	Female	97	11 - 79	41	15	0 - 64	3.10

* reaction with auto cell 4 °c overnight

** Geometric Mean Titer

ตารางที่ 3 Cold agglutinin reactions with auto and O cells at different times

Test cell	Incubation time	Cold Agglutinin Titer	
		Range	Mean*
Auto cell	2 hr	0 - 64	2.20
	overnight	0 - 128	3.17
O cell	2 hr	0 - 32	1.87
	overnight	0 - 128	2.50

* Geometric Mean Titer

ตารางที่ 4 Distribution of cold agglutinin titers in 200 samples at 4 °c overnight.

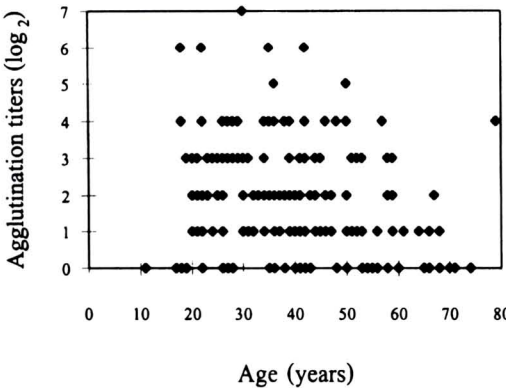
CA titers	0	1	2	4	8	16	32	64	128	Total
Cases	23	41	41	31	39	18	2	4	1	200

ช่วงโม่งทั้งของ auto cell และ O cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

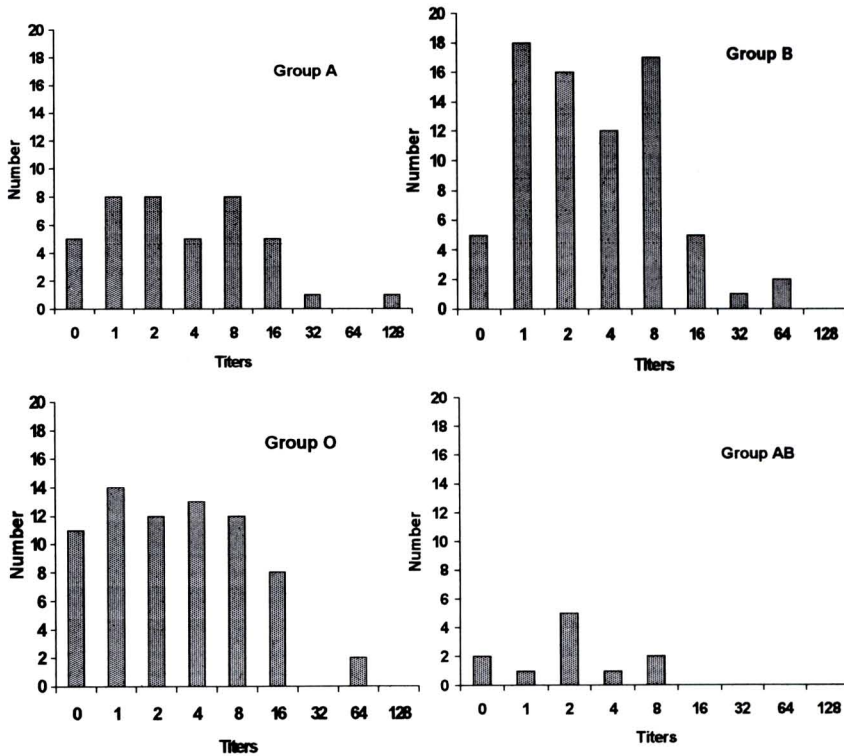
ตารางที่ 4 แสดงถึง CA titer ที่มีต่อ auto cell ที่ 4°C overnight ไม่พบ CA (negative) จำนวน 23 ราย มี CA titer 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, และ 128 จำนวน 41, 41, 31, 39, 18, 2 ,4 และ 1 รายตามลำดับ

รูปที่ 1 แสดงถึง CA titer ในคนอายุต่างๆ กันพบว่า CA titer มีแนวโน้มจะต่ำลงเล็กน้อยเมื่ออายุเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.05).

รูปที่ 2 แสดงถึง CA titer จำแนกตามหมู่เลือด



รูปที่ 1 Distribution of cold agglutinin titers and ages.



รูปที่ 2 Distribution of cold agglutinin titers in different blood groups

ต่างๆ ค่า GMT ของหมู่ A, B, O และ AB เป็น 3.5, 3.2, 3.1 และ 2.3 ตามลำดับและไม่มี ความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

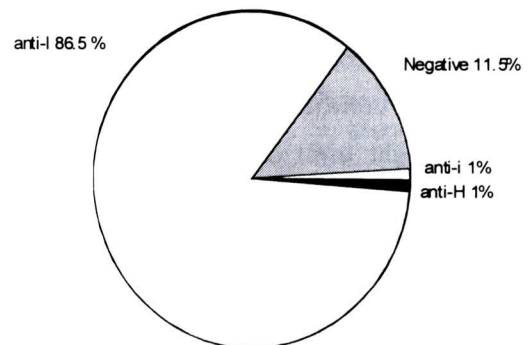
ชนิดของ normal CA แผลผลตามตารางที่ 1 จาก ตัวอย่าง 200 ราย ให้ผลลบ 23 ราย(11.5%) ให้ผลบวก 177 ราย(88.5%) โดยเป็น anti-I 173 ราย (86.5 %) anti-i 2 ราย (1%) และ anti-H 2 ราย (1%) ไม่พบ anti-Pr ดังแสดงในรูปที่ 3

มี Normal CA 10 รายที่เกิดปฏิกิริยา ตั้งแต่อุณหภูมิห้อง ด้วย titer 1 จำนวน 9 รายและ titer 2 จำนวน 1 รายทั้ง 10 ราย เป็น anti-I

anti-H พบในผู้บริจาคโลหิตชายอายุ 51 ปี หมู่เลือด B และผู้ป่วยหญิงโรคเบาหวานอายุ 64 ปีหมู่เลือด B มี auto anti-H titer 2 และ 1 ตามลำดับมี titer ต่อ OI เท่ากับ 1 ทั้ง 2 ราย anti-H ของรายที่ titer 2 สามารถ ถูก neutralized ได้ด้วย saliva H substance

anti-i พบในผู้บริจาคโลหิตทั้ง 2 รายอายุ 21 ปีและ 25 ปี หมู่เลือด A และ B มี auto anti-i titer 4 และ 8 ทั้ง 2 รายมี titer ต่อ cord blood เท่ากับ 4

Normal CA ทุกสาย (177 ราย) เป็น Ig M โดยถูก inactivated ด้วย DTT



รูปที่ 3 Percentage of cold agglutinin in 200 samples

วิจารณ์

ผลของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่าคนทั่วไปจะมี Normal CA ชนิด Ig M 88.5 % (177/200 ราย) titer ของ CA จะไม่แตกต่างกันโดย เพศ อายุ และหมู่เลือด แต่จะมีผลโดยชนิดของ cell และ incubation time โดยทำปฏิกิริยากับ auto cell ได้ดีกว่า OI cell และ overnight จะให้ titer สูงกว่า incubate 2 ชั่วโมง จากการศึกษานี้^{11,12,13} อุบัติการณ์การพบ CA จะต่ำกว่าการศึกษานี้ อาจเนื่องจากการเก็บ serum เพราะถ้าไม่แยกเก็บ serum ที่ 37°C CA จะไปจับกับ auto red cell ทำให้พบปริมาณ CA น้อยกว่าความเป็นจริง⁷ นอกจากนี้ อาจต่างกันเนื่องจากเชื้อชาติ, สิ่งแวดล้อม^{11,14} ชนิดของ cell ที่ใช้ทดสอบ อาจทำให้ได้ค่า titer ต่างกันเพราะ cell แต่ละคนมี I Ag ในปริมาณที่ต่างกัน² รายงานนี้จึงให้ auto cell ทดสอบเปรียบเทียบกับ OI (cell ชุดเดียวกันที่ทำ routine screening cell) การที่ทำปฏิกิริยากับ auto cell ได้มากกว่า O cell อาจเกิดจากความใหม่ของ cell เพราะ anti -I สามารถทำปฏิกิริยากับ cell ใหม่ได้มากกว่า cell ที่เก็บไว้เกิน 3 วัน¹³ ในขณะที่ CA จะ stable ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บ -15°C นาน 18 เดือน¹² จากการศึกษานี้ CA titer จะมี range 0 - 128 มีเพียง 7 ราย (3.5%) ที่ titer ≥ 32 ซึ่งผลเป็นเช่นเดียวกับการศึกษาอื่น ที่ว่า CA มักมี titer น้อยกว่า 322 การพบ CA ได้ที่อุณหภูมิห้อง (10/177 ราย) แม้ titer จะต่ำมาก (1-2) แต่อาจรบกวนการทำ routine test ได้ นอกจากนี้ CA อาจมีผลต่อผู้ป่วย ที่ต้องใช้ hypothermic cardiopulmonary bypass¹⁵

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้รายงานขอขอบคุณ แผนกแอนติซีรั่ม ศูนย์บริการโลหิตที่ช่วยอนุเคราะห์ cell Oh และเจ้าหน้าที่ห้องเจาะเลือดงานเคมีคลินิก กลุ่มงานพยาธิวิทยา รพ.ราชวิถี ที่ช่วยเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย และนายสมศักดิ์ ราชกุล ที่ช่วยจัดทำแผนภูมิ ตารางข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. Charlwood PA : Ultracentrifugal studies on sera containing cold haemagglutinins. Br J Haematol 1957; 3:273-5.
2. Crookstone MC. Cold agglutinins : Iso and auto. Am J Med Tech 1968;34:589-96.
3. Jefferies LC, Carchidi CM, Silberstein LE. Naturally occurring anti-i / I cold agglutinins may be encoded by different VH 3 genes as well as the VH 4.21 gene segment. J Clin Invest 1993;2821-33.
4. Harmening D. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 2nd ed. Philadelphia 1989;332-5.
5. Silberstein LE, Berkman EM, Schreiber AD. Cold hemagglutinin disease associated with Ig-G cold reactive antibody. Ann of Intern Med 1987;106:238-42.
6. สุณี สถาบันสวัสดิการ, เจริญชัย สืบแสง, บุญลักษณ์ คำอ้อม, พงษ์จันทร์ ทัดถิรัตน์, พิมล เชี่ยวศิลป์. Anti-I Autoimmune Hemolytic Anemia. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2538;4:267-8.
7. Vengelen-Tyler V, ed. Technical Manual of the American Association of Blood Banks 12th ed. Maryland 1996;662-3.
8. Roelcke D, Anstee DJ, Jungfer H, Nutzenadel W, Webb AJ. Ig G-type cold agglutinins in children and corresponding antigens : Detection of a new Pr antigen : Pra. Vox Sang 1971;20:218-29.
9. Roelcke D, Kreft H. Characterization of various anti Pr cold-agglutinins. Transfusion 1984;24:210-3.
10. Olson PR, Weiblen BJ, O' Leary JJ, Moscovitz AJ, McCullough J. A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using dithiothreitol. Vox Sang 1976;30: 149-59.
11. Booth PB, Jenkins WJ, Marsh WL. Anti - IT : A new antibody of the I blood-group system occurring in certain Melanesian sera. Brit J Haematol 1966;12:341-4.
12. Firofsky B. Autoimmunization and the autoimmune hemolytic anemia. Baltimore 1969;435.
13. Young LE. The clinical significance of cold hemagglutinins. Amer J Med Sci 1946;211:23-38.
14. Curtain CC, Baumgarten A, Gorman J, et al. Cold haemagglutinins : Unusual incidence in Melanesian populations. Brit J Haematol 1965;11:471-9.
15. Innet LM, Lester JL 3rd, Tait N. Cold agglutinins : preoperative diagnosis leads to an uneventful perfusion. Perfusion 1995;10(5):343-5.

Normal Cold Agglutinin Titer and Specificity

Tipaparn Nitaya, Anchalee Soopanit, Pongchit Khemnark and Narisa Kengtrong

Blood Bank Section, Pathology Division, Rajavithi Hospital

Abstract : Normal cold agglutinin (CA) is demonstrable with low titer in the serum of most normal, healthy individuals when testing is done at 4 °C. In cases of high titer or wide thermal range, it should be emphasized the clinical significance and sometimes interfere with routine cell and serum tests.

The sera of 100 blood donors and 100 patients at Rajavithi Hospital were studied for CA titer and specificity. They were 103 males and 97 females, aged from 11 to 79 years old. Twenty- three of them had no CA. The CA titer 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 were 41, 41, 31, 39, 18, 2, 4, and 1 cases, respectively. The specificity of CA were anti-I, anti-i anti-H for 173,2 and 2 cases respectively. Anti-Pr was not found. All of CA in this study were shown to be antibodies of the IgM class. They were inactivated with the dithiothreitol (DTT) IgM - reducing agent.

Key Words: ● Cold agglutinin ● Anti-I ● Anti-i ● Anti-H

Thai J Hematol Transf Med 1998;8:19-24.