



SHEEP CELL AGGLUTINATION TEST (SCAT) FOR THE DETECTION OF RHEUMATOID FACTOR.*

By

Lukkhana Wongsugum, B.Sc. (Med. Tech.)

Netr Suwankrughasn, B.Sc. (Med. Tech.), Cert. Imm.**

Kampol Panas-ampol, M.D.**

ในสมัยก่อนได้มีผู้สังเกตจากการทำ complement fixation test ว่า serum ของคนสามารถทำให้เกิด agglutination ของเม็ดเลือดแดงของแกะได้โดยมีจำนวนของ anti-sheep hemolysin เพียงเล็กน้อย ต่อมาในปี 1922 Mayer⁽¹⁾ ได้พบการเกิด agglutination ของ sensitized sheep cells โดย serum ของคนเพียงจำนวนเล็กน้อยซึ่ง serum จำนวนขนาดนี้ไม่สามารถทำให้ unsensitized sheep cell เกิด agglutinate ได้ ในปี 1940 Waaler⁽²⁾ จึงเกิดพบคุณสมบัติของ serum แบบเดียวกันในผู้ป่วยที่เป็น rheumatoid arthritis โดยพบว่า serum นี้จะช่วยเร่งหรือช่วยในการเกิด agglutination ของเม็ดเลือดแดงของแกะกับ anti-sheep red cell ที่ได้จากกระต่าย⁽²⁾ และได้แสดงให้เห็นว่า agglutination activating factor นั้นทนต่อความร้อน (thermostable) และอยู่ร่วมใน globulin fraction ของ serum โดยไม่มีความสัมพันธ์กับ sedimentation rate

หรือปริมาณของ Streptococcal agglutinins และไม่สามารถแยกออกจาก serum ได้โดยวิธี absorb ด้วยเม็ดเลือดแดงของแกะ แต่เขาได้ให้ข้อพิจารณาว่า ไม่มีคุณค่าในการใช้วินิจฉัยโรค rheumatoid arthritis เพราะการเกิดไม่สม่ำเสมอ

ปี 1984 Rose และคณะ⁽³⁾ ได้พบปรากฏการณ์แบบเดียวกันนี้อีกใน serum ของคนเป็น rheumatoid arthritis ในขณะที่ทำ complement fixation test สำหรับ Rickettsial pox อยู่ หลังจากทำเปรียบเทียบกับ serum อื่นๆ แล้วก็ตั้ง "differential titer" ขึ้นโดยให้เป็นความแตกต่างระหว่าง agglutination titer ของ serum ที่ทำกับ unsensitized sheep cell กับ titer ที่ทำกับ sensitized sheep cell เขาพบว่าถ้าได้ differential titer 1:16 หรือมากกว่านี้แล้ว ส่วนใหญ่มักจะเป็น serum ของคนที่มาจาก rheumatoid arthritis

* Loose-leaf booklet of Immunological techniques, WHO 1211 Geneva Switzerland, May 1970.

** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

ปี 1949 Sulkin และคณะ (4) ได้รายงานผลการทำตามวิธีของ Rose พบว่า active rheumatoid arthritis มี differential titer ต่ำกว่า 1:16 ดังนั้นจึงทำให้แยกจากคนปกติซึ่งมี titer ต่ำกว่า 1:16 ไม่ได้

Pike และคณะ (6) พบว่า degree ของ agglutination ขึ้นกับความเข้มข้นของ anti-sheep cell และพบว่า factor ที่อยู่ใน rheumatoid arthritis serum สามารถเก็บไว้ที่ -25°C หรือ 5°C เป็นเวลานาน 5 เดือน โดย titer ไม่ลดลง (7) เขาให้ชื่อ factor นี้ว่า rheumatoid factor

สำหรับการทดสอบ ครั้งนี้เป็นการศึกษาวิธี SCAT โดยเตรียมน้ำยาทุกชนิดตลอดจน anti-sheep cell serum เอง

วัสดุและวิธีการ

Alsever's solution:

Dextrose	20.5	กรัม
Sodium citrate	8.0	"
Citric acid	0.552	"
Sodium chloride	4.2	"
Dist. water up to	1	ลิตร

กรองด้วย Seitz filter, pH 6.1

Borate-succinate buffered Saline:

สารละลาย A : Succinic acid 5.9 กรัม/ลิตร

สารละลาย B: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 19.0 กรัม/ลิตร

เติมสารละลาย B ไปในสารละลาย A จนกระทั่งปรับ pH ได้ 7.5 วัดปริมาตรทั้งหมดที่ได้ แล้วละลาย Sodium chloride ลงไปใน buffer นี้ด้วยความเข้มข้น 5.6 กรัม/ลิตร

Sheep Red Blood Cell:

เจาะ Sheep red blood cell มาเก็บไว้ด้วย Alsever's solution เราสามารถเก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ที่ 4°C เวลานำ sheep red blood cell มาใช้ต้องล้างด้วย saline 3 ครั้ง โดย centrifuge 2,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ Sheep red blood cell มาทำ 50% solution ด้วย Borate-succinate buffer เพื่อใช้สำหรับ absorption of sera และ 2% solution ใช้สำหรับ sensitization

Amboceptor:

Anti sheep red blood cell เตรียมเอง โดยการฉีด 10% Sheep red blood cell เข้าทางเส้นเลือดส่วนปลายของกระต่าย immunized จนกระทั่งสร้าง antibody สูงพอแล้วเจาะ heart blood นำมาแยก serum

เก็บ anti-sheep red blood cell serum ที่ 4°C เวลาใช้ก็ dilute ด้วย Borate-succinate buffer ตามต้องการ

Rheumatoid serum:

เก็บ serum คนไข้ที่เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ไว้ในตู้เย็นที่ 4°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์หรือนานกว่านี้ และนำ serum มา inactivate ที่ 56°C เป็นเวลา 30 นาที

ก่อนทำการทดสอบทุกครั้ง

Positive control serum 0.1 ml. ชนิด Undiluted ซึ่งเก็บไว้ที่ -20°C นำมา absorb และ inactivate เพื่อทำการทดสอบต่อไป

วิธีการ

Absorption of Sera:

ใส่ 0.6 ml. 50% Sheep red blood cell กับ 0.1 ml. undiluted inactivated serum นำไป incubate เป็นเวลา 60 นาทีใน 37°C water bath แล้วทิ้งไว้ใน cold room 4°C เป็นเวลา 60 นาที นำมาปั่นที่ refrigerated centrifuge 4°C 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บ Supernatant จะได้ dilution 1:4 เพื่อนำมาทดสอบ

Titration of amboceptor; (Anti sheep red blood cell rabbit serum)

Dilute amboceptor เป็น serial dilution ด้วย Borate-succinate buffer แล้วเติม 2% sheep red blood cells นำไป incubate ใน water bath 37°C เป็นเวลา 60 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่ออ่านผล hemagglutination วันรุ่งขึ้น

หลังจากทำการทดสอบได้ titer ของ amboceptor 1:2,560 เวลาจะใช้ทุกครั้ง ต้อง dilute amboceptor ไปอีก 4 เท่า จะได้ titer 1:10,240

Sensitization of Sheep red blood cell:

เพื่อผสม 2% Sheep red blood cell กับ 1:10,240 diluted amboceptor ที่มีปริมาตรเท่ากัน แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เวลาทำการทดสอบ sensitized red cell ต้องทดสอบทันที เพราะหากจะทิ้งไว้หลังจากเตรียมแล้วต้องเก็บที่ 4°C

NOTE: Final dilution ของ sensitized red cell ที่เตรียมได้นี้ = 1%

Titration of Patient's serum:

จัด Tubes เพื่อใส่ serum รายละเอียด 8 tubes, dilute serum ผู้ป่วยซึ่ง inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาทีให้มี titer 1:4, 1:8, 1:16 จนถึง 1:512 แล้วเติม 1% sensitized sheep red cell ลงไปปริมาตรเท่ากันถึงตาราง

TUBE NO	1	2	3	4	5	6	7	8
Patient's serum, ml.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sensitized sheep red cell, in ml.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FINAL DILUTION:	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1,024

Mix ให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่ออ่านผล agglutination

Control :

นำ Positive serum control จำนวน 0.5 ml. มาผสมกับ sensitized red cell 0.5 ml. incubate ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่าน agglutination จะได้ POSITIVE

นำ negative serum control จำนวน 0.5 ml. ผสมกับ sensitized red cell 0.5 ml. incubate ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง อ่าน agglutination จะได้ NEGATIVE

ผลการทดสอบ

การทดสอบทุกครั้งจะต้องมี Positive และ Negative serum control ควบคู่กันไปด้วยเสมอ

จาก serum ของคนปกติจำนวน 50 ราย ปรากฏผล negative ทั้งหมด

จาก serum ของผู้ป่วยที่ทำการทดสอบกับ Rheumaton ให้ผล Positive เมื่อนำมาทดสอบกับ SCAT จำนวน 95 ราย ได้ผลดังตารางต่อไปนี้

Titer of agglutination	No. of positive
1:16	12
1:32	28
1:64	24
1:128	18
1:256	10
1:512	2
1:1,024	1
TOTAL	95

สรุปและวิจารณ์ผลการทดสอบ

จากการทดสอบหา Rheumatoid factor โดยวิธี SCAT จาก serum ของคนปกติจำนวน 50 ราย (จากธนาคารเลือด) ปรากฏผล negative ทั้งหมด และจาก serum ของผู้ป่วยที่ทำการทดสอบกับ Rheumaton ให้ผล Positive แล้วนำมาทดสอบกับ SCAT จำนวน 95 ราย ได้ titer 1:16 จำนวน 12 ราย, 1:32 จำนวน 28 ราย, 1:64 จำนวน 24 ราย, 1:128 จำนวน 18 ราย, 1:256 จำนวน 10 ราย, 1:512 จำนวน 2 ราย และ 1:1,024 จำนวน 1 ราย titer ที่พอจะบอกได้ว่า RF positive คือ 1:16

จากการศึกษาของ Heller และคณะ(8) ได้ดัดแปลงวิธีใหม่ โดยทำ selective absorption ของ non-specific factors ด้วย Sheep red cells จากการเปรียบเทียบกับ serum ที่ไม่ได้ absorb (วิธีของ Rose) ผลที่ได้พบว่า 90% ของผู้ป่วยด้วย active peripheral rheumatoid arthritis จะ positive วิธีของ Rose จะ positive เพียง 61% และวิธีของ Streptococcus agglutination test (SAT) จะ positive เพียง 58% ทุกรายที่ให้ผล negative เมื่อทดสอบด้วยวิธีของ Rose และ SAT ก็จะเป็น negative ด้วย เขาวิจารณ์ไว้ว่า agglutination ของ unsensitized sheep red cell โดย human sera เกิดเนื่องจาก Forssmann antibody (natural amboceptor) ซึ่ง antibody นี้ไม่เกี่ยวข้องกับ hemagglutinin ที่รวมอยู่ใน active rheumatoid arthritis หรือไม่จำเป็นในปฏิกิริยากับ sensitized red cell,

Rh factor ทำตัวคล้ายกับเป็น antibody ทั้ง^๕นี้ โดยการศึกษาทาง selective absorption และการที่มัน identity กับส่วนหนึ่งของ beta-gamma globulin-complex โดยทาง serology แล้ว factor นี้ต่างจาก natural amboceptor ของ human serum และต่างกับ heterophile antibody ใน Infectious mononucleosis

REFERENCES:

1. Meyer, K. Ueber "Hemagglutininvermetrung and Hemagglutinal" for dernde wirkung bei menschlichen Seren-Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. therap. 34:229-234, 1922.
2. Waaler, E. on the occurence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Acta. path. et. microbiol. Scandinav.; 17:172-188, 1940.
3. Rose HM, Ragan, C., Pearce, E. and Lipman, M.O. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 68: 1-6, 1948.
4. Sulkin, S.E., Pike, R.M. and Coggeshall, H.C. Specific of differential sheep cell agglutination test in rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 70:475-479, 1949.
5. Pike, R.M., Sulkin, S.E. and Coggeshall, H.C. "Serological reactions in rheumatoid arthritis". II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sensitized sheep erythrocytes. J. Immunol. 63:447-463, 1949.
6. Pike, M.R. Sulkin, S.E. and H. C. Coggeshall. Serological reaction in rheumatoid arthritis. I. Factors affecting the agglutination of sensitized sheep erythrocytes in Rheumatoid arthritis serum. J. Immunol. 63:441-446, 1949.
7. Heller, G. Jacobson, M.S. and M.H. Kolodney : A modification of the hemagglutination test for Rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 72:316-323, 1949.
8. Alexander, R. and de Forest, G.K. : The sensitized sheep cell agglutination reaction in Rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. 16:191-196, 1954.
9. Anderson, S.d.; Bentzon, M.H. Houba, U. and Krag. P.: International reference preparation of rheumatoid arthritis serum. Bull. Wld. Hlth. Org. 42:311, 1970.

10. Ball, J. serum factor in rheumatoid arthritis agglutination sensitized sheep cell, *Lancet* 2: 520, 1950.
11. Christian, C.L.: In laboratory diagnostic procedure in the Rheumatoid disease, ed. by Cohen, A. Boston, Mass., Little, Brown and Co. p. 84, 1967.

ABSTRACT:

The detection of Rheumatoid factor by sheep red cell agglutination test (SCAT) was performed in the negative and positive sera. SCAT technique was proposed by the Medi-

cal Research Council in conjunction with WHO as modified at the International Reference Center for Serology of Autoimmune Disorders, Middlesex Hospital School; London.

It was found that positive scat results were obtained from all 95 sera following the positive Rheumatoid test ranging from the titer of 1:16 through 1:1,024. SCAT also gave negative results to the 50 negative sera.

From this study, the SCAT is sensitive to the Rheumatoid factor in the serum of patients with Rheumatoid arthritis with the lowest titer of 1:16.
