

Mimic of Anti-f (IgM) by Combination of Anti-c (IgM) and Anti-e (IgM) for Comparison with Reported Patient's Anti-f (IgM/IgG or IgG)

**Choedchai Saehuan*, Nattaphat Paiboonsiri, Pawanrat Yungprasertkul
and Faprathan Pikwong**

*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand*

Abstract

The f (ce) antigen is a compound antigen in Rh blood group system expressing on red blood cells when c and e antigens are formed by genes on the same chromosome. Anti-f alloimmunization occurs when a patient without the f antigen is transfused with blood carrying the f antigen. Anti-f is concerned in hemolytic transfusion reaction. The majority of anti-f found is IgG while the minority is IgM. A low frequency anti-f has been reported in a patient in Thailand. The objective of this work was to produce mimic of anti-f (IgM) by combination of anti-c (IgM) and anti-e (IgM), and compare the reaction pattern with the reported patient's anti-f (IgM/IgG or IgG). The mimic of anti-f (IgM) was studied with antibody screening, antibody identification, adsorption-elution technique followed by antibody screening and antibody identification of eluate, antibody distinguishing with dithiothreitol and potency testing. The results showed that antibody screening of mimic of anti-f (IgM) presented 4+ for all screening cells O1-4 with antigen c and/or e (R1R1, R1R2, rr) whereas patient's anti-f (IgM/IgG or IgG) was reported 3+ with only O4 with ce antigen (rr). Antibody identification of mimic of anti-f (IgM) revealed 4+ for all panel cells 1-11 (P1-11) with antigen c and/or e (R1R1, R1R2, R2R2, R1Rz, R1r, rr, r'r, r''r) whereas patient's anti-f (IgM/IgG or IgG) was reported 2-3+ with P4, P9-11 carrying antigen ce (R1r, rr, r'r, r''r). Antibody screening and antibody identification of eluate demonstrated 1+ with O1-4 and 1+ with P1-11 at RT, 37°C and AHG the reaction pattern of which was identical with mimic of anti-f (IgM) and mimic of anti-f (IgM) exhibited the potency of 128. This research indicated that mimic of anti-f (IgM) had different characteristics from

*Corresponding author E-mail address: choedchais@nu.ac.th, choedchai1@hotmail.com

Received: 13 December 2021

Revised: 17 April 2022

Accepted: 26 July 2022

patient's anti-f which was antibody to compound antigen f (ce) and not to either antigen e or c. Reaction pattern of mimic of anti-f (IgM) could be a practical way of antibody identification to separate patients' anti-f from anti-c + anti-e which might be found in the future.

Keywords: Mimic of anti-f (IgM), Anti-c (IgM), Anti-e (IgM), Reported patient's anti-f (IgM/IgG or IgG)

Anti-f (IgM) จำลองโดยการรวมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) เปรียบเทียบกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงาน

เชิดชาย แซ่ฮ่วน* ญัฐภัทร ไพบูลย์ศิริ ปวันรัตน์ ยังประเสริฐกุล และ ฟ้าประทาน ปิกวงศ์

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

แอนติเจน f (ce) เป็นแอนติเจนผสมในหมู่เลือดระบบ Rh ที่แสดงออกบนเม็ดเลือดแดงเมื่อแอนติเจน c และ e เกิดจากยีนบนโครโมโซมเส้นเดียวกัน ผู้ป่วยที่ไม่มีแอนติเจน f และได้รับเลือดที่มีแอนติเจน f จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง anti-f ซึ่งก่อให้เกิด hemolytic transfusion reaction โดยที่ anti-f ในผู้ป่วยส่วนมากเป็น IgG แต่ส่วนน้อยเป็น IgM และมีรายงานผู้ป่วยในประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อผลิต anti-f (IgM) จำลอง โดยการรวมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) และศึกษาลักษณะรูปแบบปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงาน โดยนำ anti-f (IgM) จำลองมาตรวจกรองแอนติบอดี ตรวจแยกชนิดแอนติบอดี ใช้เทคนิค adsorption-elution เพื่อนำ eluate มาตรวจกรองแอนติบอดี ตรวจแยกชนิดแอนติบอดี ตรวจชนิดของแอนติบอดีด้วย dithiothreitol และทดสอบหาความแรง ผลการวิจัยพบว่า การตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองให้ผล 4+ กับ screening cells O1-4 ที่มีแอนติเจน c และ/หรือ e ทุกเซลล์ (R1R1, R1R2, rr) ส่วน anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงานให้ผล 3+ กับ O4 ที่มีแอนติเจน ce (rr) เท่านั้น การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองให้ผล 4+ กับ panel cells 1-11 ที่มีแอนติเจน c และ/หรือ e ทุกเซลล์ (R1R1, R1R2, R2R2, R1Rz, R1r, rr, r'r, r''r) ส่วน anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงานให้ผล 2-3+ กับ P4, P9-11 ที่มีแอนติเจน ce (R1r, rr, r'r, r''r) ผลการทดสอบ eluate ด้วยการตรวจกรองแอนติบอดีให้ผล 1+ กับ O1-4 และการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีให้ผล 1+ กับ P1-11 ที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG รูปแบบปฏิกิริยาเหมือน anti-f (IgM) จำลอง และ anti-f (IgM) จำลองมีความแรง 128 งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่า anti-f (IgM) จำลองมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก anti-f ที่พบในผู้ป่วยซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจนผสม f (ce) ไม่ใช่แอนติเจน c หรือ e ตัวใดตัวหนึ่ง รูปแบบปฏิกิริยา anti-f (IgM) จำลองอาจใช้เป็นแนวทางสำหรับการตรวจแยกชนิด anti-f ออกจาก anti-c ที่พบร่วมกับ anti-e ในผู้ป่วยที่อาจพบได้ต่อไป

คำสำคัญ: Anti-f (IgM) จำลอง, Anti-c (IgM), Anti-e (IgM), Anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงาน

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: choedchais@nu.ac.th, choedchai1@hotmail.com

รับบทความ: 13 ธันวาคม 2564

แก้ไขบทความ: 17 เมษายน 2565

รับตีพิมพ์บทความ: 26 กรกฎาคม 2565

บทนำ

แอนติเจน f (ce) เป็นแอนติเจนผสม (compound antigen) ในหมู่เลือดระบบ Rh ที่แสดงออกบนเม็ดเลือดแดงเมื่อแอนติเจน c และ e เกิดจากยีนบนโครโมโซมเส้นเดียวกัน (cis position)⁽¹⁾ anti-f เป็น single antibody แต่ให้ปฏิกิริยาเหมือน multiple antibodies ได้รับการกระตุ้นให้สร้างขึ้นในผู้ป่วยที่ไม่มีแอนติเจน f และได้รับเลือดที่มีแอนติเจน f ดังนั้น anti-f ในผู้ป่วยมีความสำคัญทางคลินิกที่ทำให้เกิด hemolytic transfusion reaction (HTR)⁽²⁾ และ hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN)⁽³⁻⁴⁾ โดยที่ anti-f ในผู้ป่วยส่วนมากพบเป็น immunoglobulin G (IgG) แต่ส่วนน้อยเป็น immunoglobulin M (IgM) จากรายงานของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ พบ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยซึ่งเป็น naturally acquired alloantibody

ปี พ.ศ. 2553 การศึกษาแอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย⁽⁶⁾ พบ single antibody อันดับ 1-3 ได้แก่ anti-Mi^a, anti-E และ anti-I และ multiple antibodies อันดับ 1-3 ได้แก่ anti-E + anti-c , anti-E + anti-Mi^a และ anti-C + anti-e ในปี พ.ศ. 2550 Saipin J และคณะ⁽⁷⁾ พบผู้ป่วยที่มี anti-Jk^a, anti-Fy^b และ anti-f (IgG) ทำให้มีความซับซ้อนในการตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) และการตรวจแยกชนิดแอนติบอดี (antibody identification)⁽⁷⁻⁸⁾ โดยการตรวจกรองแอนติบอดีจะได้ผลบวกเนื่องจาก screening cells มีแอนติเจน Jk^a, Fy^b แต่ไม่มี f และต้องนำซีรัมมา crossmatch กับเลือดผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจน Jk^a Fy^b และ f จึงจะได้ผล compatible

anti-f ในผู้ป่วยที่มีรายงานในทวีปเอเชียมีดังนี้ ปี พ.ศ. 2550 Chow PK และคณะ⁽⁹⁾ พบ

anti-f (IgG) และ Saipin J และคณะ พบ anti-f (IgG)⁽⁷⁾ ในประเทศไทย ต่อมาในปี พ.ศ. 2558 รายงานผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ พบ anti-f (IgM/IgG or IgG) โดยพบ 1 รายใน 73,636 ราย (ร้อยละ 0.0014) หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2559 Nah H และคณะ⁽¹⁰⁾ พบ anti-f (IgG) เป็นรายที่สองในประเทศเกาหลีใต้ และปี พ.ศ. 2563 รายงานผู้ป่วยของ Alharbi A และคณะ⁽¹¹⁾ พบ anti-f (IgG) โอกาสพบ anti-f ในผู้ป่วยแม้ไม่สูงมากแต่มีความสำคัญ ที่ห้องปฏิบัติการควรทราบลักษณะและรูปแบบการทำปฏิกิริยาของ anti-f เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจแยกชนิดแอนติบอดี

วิธีการสร้างแอนติบอดีต่อระบบหมู่เลือดจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยใช้เทคนิค hybridoma technology เช่น การผลิต anti-E (IgM) โดยการแยก B cells จาก buffy coat ของผู้บริจาคที่สร้าง anti-E มาเชื่อมกับ human myeloma cells เมื่อ hybridoma cells มีขนาดโคโลนีที่เหมาะสมจึงดูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง และตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีซึ่งวิธีดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานาน⁽¹²⁾ ปัจจุบันยังไม่มี anti-f จำหน่าย และ anti-f ในผู้ป่วยเองก็พบได้ยาก โดย anti-f ที่พบในผู้ป่วยส่วนมากเป็น IgG แต่งานวิจัยนี้ไม่สามารถหา anti-c (IgG) และ anti-e (IgG) ได้ และเคยมีการรายงาน anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วย⁽⁵⁾ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงผลิต anti-f (IgM) จำลองโดยการรวมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) เพื่อศึกษารูปแบบปฏิกิริยา โดยมีสมมุติฐานว่าเมื่อผู้ป่วยมี anti-c + anti-e จะบวกกับเซลล์ที่มีแอนติเจน c และ/หรือ e แตกต่างจาก anti-f ที่จะบวกกับเซลล์ที่มีแอนติเจน ce เท่านั้น และอาจใช้เป็นแนวทางการตรวจแยกชนิด anti-f ออกจาก anti-c ที่พบร่วมกับ anti-e ในผู้ป่วยที่อาจพบได้ต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต anti-f (IgM) จำลอง โดยการรวมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) และศึกษารูปแบบปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงาน โดยนำ anti-f (IgM) จำลองมาตรวจกรองแอนติบอดี ตรวจแยกชนิดแอนติบอดี ทำ adsorption-elution แล้วนำ eluate มาตรวจกรอง แอนติบอดี ตรวจแยกชนิดแอนติบอดี ตรวจชนิดของ แอนติบอดี (antibody distinguishing) ด้วย dithiothreitol (DTT) ทดสอบหาความแรง (potency testing) และเปรียบเทียบรูปแบบปฏิกิริยา

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างใช้ anti-f (IgM) โดยการรวมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) ซึ่งเตรียมด้วยการผสม anti-c (IgM) 5 มิลลิลิตร และ anti-e (IgM) 5 มิลลิลิตร หรืออัตราส่วน 1:1 โดยโครงการวิจัยเป็นการศึกษาในมนุษย์ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ใบรับรอง (COA) 476/2020 ลงวันที่รับรอง 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2563

2. วัสดุที่ใช้ในการศึกษา

2.1 anti-A (MOAb) Lot NO. 63023, anti-D (IgM/IgG) Lot NO. 61032, anti-D (IgG) Lot NO. 61010, anti-c (IgM) Lot NO. 63010 และ antihuman globulin (AHG) Lot NO. 63011 จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย anti-e (IgM) Lot NO. 10630 56 03 Bio-Rad, USA, dithiothreitol (DTT) Thermo Scientific, USA, Phosphate Buffer Saline (PBS) และ Normal Saline Solution (NSS)

2.2 3% A cells Lot NO. 63080,

screening cells O1, O2 Lot NO. 63083, O3 Lot NO. 63080 และ O4 เตรียมจาก panel cells 9 Lot NO. 63080 (O1-4), panel cells 1-11 (P1-11) Lot NO. 63080 และ Coombs Control Cells (CCC) Lot NO. 63080 จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

3. วิธีการศึกษา

3.1 การตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน (conventional tube technique)

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 × 75 mm 24 หลอด แบ่งเป็น 6 ชุด ๆ ละ 4 หลอด โดย negative control (NC) ด้วย anti-A (MoAb), positive control (PC) ด้วย anti-D (IgM/IgG) และ anti-D (IgG) แอนติบอดีสำหรับการตรวจครั้งนี้ anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) ในแต่ละชุดระบุ O1-4 หยด แอนติบอดี 50 ไมโครลิตร ตามด้วย O1-4 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) 5 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 1,000 × g 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 1,000 × g 15 วินาที นำทุกหลอดมาปั่นล้าง 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 1,000 × g 45 วินาที แล้วหยด AHG 2 หยด ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 1,000 × g 15 วินาที ถ้าให้ผลลบต้องนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าให้ผลลบจริง หยด CCC 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลลบ ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 1,000 × g 15 วินาที⁽¹³⁾

3.2 การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 × 75 mm 66 หลอด แบ่งเป็น 6 ชุด ๆ ละ 11 หลอด โดย NC ด้วย anti-A (MoAb), PC ด้วย anti-D (IgM/IgG)

และ anti-D (IgG) แอนติบอดีสำหรับการตรวจ ดังนี้ anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) ในแต่ละชุดระบุ P1-11 หยดแอนติบอดี 50 ไมโครลิตร ตามด้วย P1-11 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที นำทุกหลอดมาปั่นล้าง 3 ครั้ง ที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 45 วินาที แล้วหยด AHG 2 หยด ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที ถ้าให้ผลลบต้องนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าให้ผลลบจึงหยด CCC 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลลบ ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที⁽¹³⁾

3.3 เทคนิค adsorption-elution ของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธี Lui freeze-thaw elution

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12×75 mm 3 หลอด หยด anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) 240 ไมโครลิตร ตามด้วย adsorbed cells 240 ไมโครลิตร ดังนี้ O4, O2 และ O2 ตามลำดับ นำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 60 นาที นำมาปั่นที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 5 นาที ถ่าย adsorbed serum ลงในหลอดทดลอง และเก็บเม็ดเลือดแดงไว้เตรียม eluate หลังจากนั้นนำมาปั่นล้างอย่างน้อย 6 ครั้ง เก็บน้ำล้างครั้งสุดท้ายไว้เป็นหลอดควบคุม หยด NSS 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางในตู้แช่แข็ง 10 นาที จากนั้นนำมาละลายภายใต้ น้ำประปา แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 2 นาที คูด eluate ไว้ในหลอดทดลอง⁽¹³⁾ แล้วนำไปตรวจกรองแอนติบอดี และแยกชนิดแอนติบอดีโดยทำควบคู่กับน้ำล้างครั้งสุดท้าย

3.3.1 การตรวจกรองแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12×75 mm 16 หลอด แบ่งเป็น 4 ชุดๆ ละ 4 หลอด โดย NC ด้วย anti-A (MoAb), PC ด้วย anti-D (IgM/IgG) และ anti-D (IgG) และ eluate ในแต่ละชุดระบุ O1-4 หยดแอนติบอดี 50 ไมโครลิตร ตามด้วย O1-4 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ RT 5 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที นำทุกหลอดมาปั่นล้าง 3 ครั้ง ที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 45 วินาที แล้วหยด AHG 2 หยด ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที ถ้าให้ผลลบจะต้องนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าให้ผลลบจึงหยด CCC 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลลบ ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ 15 วินาที⁽¹³⁾

3.3.2 การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12×75 mm 44 หลอดแบ่งเป็น 4 ชุดๆ ละ 11 หลอดโดย NC ด้วย anti-A (MoAb), PC ด้วย anti-D (IgM/IgG) และ anti-D (IgG) และ eluate ในแต่ละชุดระบุ P1-11 หยดแอนติบอดี 50 ไมโครลิตร ตามด้วย P1-11 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็วรอบ $1,000 \times g$ เวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้วปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ เวลา 15 วินาที นำทุกหลอดมาปั่นล้าง 3 ครั้ง ที่ความเร็ว $1,000 \times g$ เวลา 45 วินาที แล้วหยด AHG หลอดละ 2 หยด ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ เวลา 15 วินาที ถ้าให้ผลลบต้องนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าให้ผลลบจึงหยด CCC 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลลบ ปั่นอ่านผลที่ความเร็ว $1,000 \times g$ เวลา 15 วินาที⁽¹³⁾

3.4 การตรวจชนิดของแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วย dithiothreitol (DTT)

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 × 75 mm 12 หลอด ประกอบด้วยหลอดทดลอง 6 หลอด ได้แก่ หลอด anti-f (IgM) จำลอง treated, anti-f (IgM) จำลอง untreated, anti-c (IgM) treated, anti-c (IgM) untreated, anti-e (IgM) treated และ anti-e (IgM) untreated, PC 4 หลอด ได้แก่ หลอด anti-D (IgM/IgG), anti-D (IgM/IgG) untreated, anti-D (IgG) treated และ anti-D (IgG) untreated และ NC 2 หลอด ได้แก่ หลอด NSS treated และ NSS untreated หลังจากนั้นหยด แอนติบอดี 100 ไมโครลิตร แล้วหยด 0.01 M DTT 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด treated และ PBS 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด untreated นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเจือจางดังนี้ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 และ 1:1,024 ตามด้วยหยด P9 50 ไมโครลิตร⁽¹³⁾

3.5 การทดสอบหาความแรงของ anti-f (IgM) จำลอง

เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 × 75 mm 50 หลอด แบ่งเป็นชุดๆ ละ 10 หลอด โดย NC ด้วย PBS และ PC ด้วย anti-A (MoAb) แอนติบอดีทดสอบ ดังนี้ anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) นำ NC, PC และแอนติบอดีทดสอบไปเจือจางดังนี้ undiluted, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ 1:512 จากนั้นหยด 3% A cells 50 ไมโครลิตร ในหลอด NC และ PC, P9 50 ไมโครลิตร ในหลอด anti-f (IgM) และ O2 50 ไมโครลิตร ในหลอด anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) หลังจากนั้นนำไปปั่นอ่านผลที่ความเร็ว 1,000 × g 15 วินาที⁽¹³⁻¹⁴⁾

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบรูปแบบปฏิกิริยาระหว่าง anti-f (IgM) จำลองกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยที่มีการรายงาน

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลอง ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานให้ผล 4+ กับ O1 (R1R1, DCCee), O2 (R1R2, DCcEe), O3 (R1R1, DCCee) และ O4 (rr, dccee) ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG เมื่อเปรียบเทียบกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ ให้ผล 3+ กับ O4 ที่ทำเฉพาะขั้นตอน AHG และ anti-f (IgG) ในผู้ป่วยของ Saipin J และคณะ⁽⁷⁾ ให้ผล 3+ กับ O4 ที่ขั้นตอน AHG เท่านั้น (Table 1)

2. ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานให้ผล 4+ กับ P1-11 ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG เมื่อเปรียบเทียบกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ ให้ผล 2-3+ กับ P9-11 ที่ทำเฉพาะขั้นตอน AHG และ anti-f (IgG) ในผู้ป่วยของ Saipin J และคณะ⁽⁷⁾ ให้ผล 3+ กับ P4, P9-11 ที่ขั้นตอน AHG เท่านั้น (Table 2)

Table 1 The results of antibody screening of mimic of anti-f (IgM) by conventional tube technique.

Screening cells			Mimic of anti-f (IgM)			Patient's anti-f (IgM/IgG or IgG) ⁽⁵⁾			Patient's anti-f (IgG) ⁽⁷⁾		
			RT	37°C	AHG	RT	37°C	AHG	RT	37°C	AHG
O1	R1R1	DCCee	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
O2	R1R2	DCcEe	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
O3	R1R1	DCCee	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
O4	rr	dccee	4+	4+	4+	NT	NT	3+	0	0	3+

NT = not tested

Table 2 The results of antibody screening of mimic of anti-f (IgM) by conventional tube technique.

Panel cells			Mimic of anti-f (IgM)			Patient's anti-f (IgM/IgG or IgG) ⁽⁵⁾			Patient's anti-f (IgG) ⁽⁷⁾		
			RT	37°C	AHG	RT	37°C	AHG	RT	37°C	AHG
P1	R1R1	DCCee	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P2	R1R1	DCCee	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P3	R1R1	DCCee	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P4	R1r	DCcee	4+	4+	4+	NT	NT	ND	0	0	3+
P5	R1Rz	DCCEe	4+	4+	4+	NT	NT	ND	0	0	0
P6	R1R2	DCcEe	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P7	R1R2	DCcEe	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P8	R2R2	DccEE	4+	4+	4+	NT	NT	0	0	0	0
P9	rr	dccee	4+	4+	4+	NT	NT	3+	0	0	3+
P10	r'r	dCcee	4+	4+	4+	NT	NT	2+	0	0	3+
P11	r''r	dcCEe	4+	4+	4+	NT	NT	2+	0	0	3+

ND = no data

NT = not tested

3. ผลเทคนิค adsorption-elution ของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธี Lui freeze-thaw elution

3.1 ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานพบว่า ให้ผล 1+ กับ

O1-4 ที่ขึ้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG (Table 3)

3.2 ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน

ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ eluate ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานพบว่า ให้ผล 1+ กับ

P1-11 ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และคณะ⁽⁵⁾ ให้ผล 2-3+ กับ P9-11 ที่ทำเฉพาะ และ AHG เมื่อเปรียบเทียบกับ eluate ของ anti-f ขั้นตอน AHG (Table 4) (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y

Table 3 The results of antibody screening of eluate by conventional tube technique.

Antibody	Adsorption-elution	Screening cells	Result			
			RT	37°C	AHG	CCC
Mimic of anti-f (IgM)	Last wash	O1 R1R1 DCCee	0	0	0	2+
	Eluate		1+	1+	1+	NT
	Last wash	O2 R1R1 DCCee	0	0	0	2+
	Eluate		1+	1+	1+	NT
	Last wash	O3 R1R2 DCCee	0	0	0	2+
	Eluate		1+	1+	1+	NT
	Last wash	O4 rr dccee	0	0	0	2+
	Eluate		1+	1+	1+	NT

NT = not tested

Table 4 The results of antibody identification of eluate by conventional tube technique.

Panel cells			Eluate			Eluate of patient's anti-f (IgM/IgG or IgG) ⁽⁵⁾		
			RT	37°C	AHG	RT	37°C	AHG
P1	R1R1	DCCee	1+	1+	1+	NT	NT	0
P2	R1R1	DCCee	1+	1+	1+	NT	NT	0
P3	R1R1	DCCee	1+	1+	1+	NT	NT	0
P4	R1r	DCcee	1+	1+	1+	NT	NT	ND
P5	R1Rz	DCCEe	1+	1+	1+	NT	NT	ND
P6	R1R2	DCcEe	1+	1+	1+	NT	NT	0
P7	R1R2	DCcEe	1+	1+	1+	NT	NT	0
P8	R2R2	DccEE	1+	1+	1+	NT	NT	0
P9	rr	dccee	1+	1+	1+	NT	NT	3+
P10	r'r	dCcee	1+	1+	1+	NT	NT	2+
P11	r''r	dccEe	1+	1+	1+	NT	NT	2+

ND = no data

NT = not tested

4. ผลการตรวจชนิดของแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วย dithiothreitol (DTT)

ผลการตรวจชนิดของแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วย DTT พบว่า anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) เป็น IgM (Table 5)

5. ผลการทดสอบหาความแรงของ anti-f (IgM) จำลอง

ผลการทดสอบหาความแรงของ anti-f (IgM) จำลอง พบว่าความแรงของ anti-f (IgM) จำลอง anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) เท่ากับ 128, 128 และ 256 ตามลำดับ (Table 6)

Table 5 The results of antibody distinguishing of mimic of anti-f (IgM) with dithiothreitol.

Antibody	Status	Titer			Antibody class
		RT	37°C	AHG	
Mimic of anti-f (IgM)	Untreated	64	64	32	IgM
	Treated	0	0	8	
Anti-c (IgM)	Untreated	64	256	128	IgM
	Treated	0	0	32	
Anti-e (IgM)	Untreated	64	64	16	IgM
	Treated	0	0	0	

Table 6 The results of potency testing of mimic of anti-f (IgM).

Antibody	Screening cells			Potency
Mimic of anti-f (IgM)	O4	rr	dccee	128
Anti-c (IgM)	O1	R1R2	DCcEe	128
Anti-e (IgM)	O1	R1R2	DCcEe	256

วิจารณ์

หมู่เลือดระบบ Rh เกิดจากยีน *RHD* ที่กำหนดแอนติเจน D และ *RHCE* ที่กำหนดแอนติเจน C, c, E และ e นอกจากนี้ยังมีแอนติเจนผสมที่แสดงออกบนเม็ดเลือดแดงเมื่อแอนติเจนเกิดจากยีนบนโครโมโซมข้างเดียวกัน (cis gene products) ได้แก่ แอนติเจน f (Rh6), Ce (Rh7), CE (Rh22) และ cE (Rh27)⁽¹⁾ โดยพบ anti-f (IgG) ในผู้ป่วย

เป็นส่วนใหญ่ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกสามารถทำให้เกิด HTR⁽²⁾ และ HDFN⁽³⁻⁴⁾ นอกจากนี้ anti-f (IgM/IgG or IgG) ยังพบได้ในผู้ป่วยจากรายงานของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾

การตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานในงานวิจัยนี้ใช้ O3-4 เพิ่มเติมนอกเหนือจาก O1-2 ซึ่งใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดีประจำวันในงานวิทยาศาสตร์

การบริการโลหิต⁽¹⁴⁾ ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน ให้ผล 4+ กับ O1-4 ซึ่งมีแอนติเจน c และ/หรือ c ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG ไม่สอดคล้องกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ ซึ่งให้ผล 3+ กับ O4 ซึ่งมีเฉพาะแอนติเจน f (ce) โดยทำปฏิกิริยาที่ขั้นตอน AHG เช่นเดียวกับ anti-f (IgG) ในผู้ป่วยของ Saipin J และคณะ⁽⁷⁾ ให้ผล 3+ กับ O4 ที่ขั้นตอน AHG เท่านั้น

ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐาน ให้ผล 4+ กับ P1-11 ซึ่งมีแอนติเจน c และ/หรือ c ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG ไม่สอดคล้องกับ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ ให้ผล 2-3+ กับ P9-11 ที่ทำเฉพาะขั้นตอน AHG และ anti-f (IgG) ในผู้ป่วยของ Saipin J และคณะ⁽⁷⁾ ที่ให้ผล 4+ กับ P4, P9-P11 ที่ขั้นตอน AHG เท่านั้น โดยที่ P4, P9-P11 มีแอนติเจน f (ce)

ผลการตรวจกรองแอนติบอดีและแยกชนิดแอนติบอดีของ eluate จากวิธี Lui freeze-thaw elution ด้วยวิธีหลอดทดลองมาตรฐานพบว่า ให้ผล 1+ กับ O1-4 และ P1-11 ตามลำดับ ที่ขั้นตอนอุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส และ AHG โดยมีรูปแบบปฏิกิริยาเหมือนกับ anti-f (IgM) จำลองที่นำมาทำ adsorption ซึ่งจะทำการปฏิกิริยากับทุกเซลล์ที่มีแอนติเจน c และ/หรือ c เทคนิค adsorption-elution นี้ มีการยืนยันความจำเพาะต่อ anti-f (IgM/IgG or IgG) ในผู้ป่วยของ Nakamura Y และคณะ⁽⁵⁾ ซึ่งพบว่าแอนติบอดีในคนไข้จะถูกดูดซับด้วยเซลล์ที่มีแอนติเจน f (ce) เท่านั้น และ eluate ที่ได้ก็ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเซลล์ที่มีแอนติเจน f (ce) เท่านั้นเช่นกัน

ผลการตรวจชนิดแอนติบอดีของ anti-f (IgM) จำลองด้วย DTT พบ anti-f (IgM) จำลองและ anti-c (IgM) เป็น IgM โดยมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ขั้นตอน AHG ในหลอด treated เนื่องจาก anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) มีลักษณะของการเป็น thermostable สามารถจับกับแอนติเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบวกที่ AHG⁽¹⁾ ซึ่งจะสามารถตรวจยืนยันชนิดของแอนติบอดีด้วยวิธี flow cytometry ตามงานวิจัยของ Alzate MA และคณะ⁽¹⁵⁾ โดยใช้ antihuman IgG และ antihuman IgM ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงต่างชนิดกัน

ผลการทดสอบหาความแรงของ anti-f (IgM) จำลองพบว่า ความแรงของ anti-f (IgM) จำลองเท่ากับ 128 ต่อ P9 ซึ่งมีแอนติเจน f (ce) โดยมีค่าเท่ากับของ anti-c (IgM) แต่น้อยกว่าของ anti-e (IgM) ที่ 256

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แม้ anti-f (IgM) จำลองที่เตรียมได้จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก anti-f ที่พบในผู้ป่วย แต่ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า รูปแบบปฏิกิริยาการตรวจกรองแอนติบอดีและการแยกชนิดแอนติบอดีที่พบ anti-f และที่พบ anti-c ร่วมกับ anti-e มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดย anti-f จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเซลล์ที่มีแอนติเจน f (ce) คือเซลล์ที่มีจีโนไทป์เป็น r หรือ R0 ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง ในขณะที่ anti-f (IgM) จำลองจากการผสมกันของ anti-c (IgM) และ anti-e (IgM) จะทำปฏิกิริยากับทุกเซลล์ที่มีแอนติเจน c และ/หรือ e ทั้ง r, r', r'', R0, R1, R2 ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง ซึ่งจะทำการปฏิกิริยากับ screening cells หรือ panel cells ทุกเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบทั่วไป ความแตกต่างของรูปแบบปฏิกิริยาที่พบอาจใช้เป็นแนวทางในการตรวจแยกชนิด anti-f ออกจาก anti-c ที่พบร่วมกับ anti-e สำหรับห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดได้

สรุป

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่า anti-f (IgM) จำลองมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก anti-f ที่พบในผู้ป่วยซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจนผสม f (ce) ไม่ใช่แอนติเจน c หรือ e ตัวใดตัวหนึ่ง รูปแบบปฏิกิริยา anti-f (IgM) จำลองอาจใช้เป็นแนวทางการตรวจแยกชนิด anti-f ออกจาก anti-c ที่พบร่วมกับ anti-e ในผู้ป่วยที่อาจพบได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยบางส่วนจากทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาตรี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Blaney KD, Howard PR. Basic and applied concepts of blood banking and transfusion practices. 4th ed. St.Louis: Elsevier; 2017.
2. Levine P, White J, Stroup M, Zmijewski CM, Mohm JF. Haemolytic disease of the newborn probably due to anti-f. *Nature* 1960; 185: 188-9.
3. Spielmann W, Seidl S, von Pawel J. Anti-ce (anti-f) in a CDe-cD-mother, as a cause of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1974; 27: 473-7.
4. O'Reilly RA, Lombard CM, Azzi RL. Delayed hemolytic transfusion reaction associated with Rh antibody anti-f: first reported case. *Vox Sang* 1985; 49: 336-9.
5. Nakamura Y, Ohsawa T. Successful identification of anti-f alloantibody in a non-transfused male patient employing ID-Micro Typing System Gel Cards. *J Blood Disord Transfus* 2015; 6: 1-4.
6. Kupatawintu P, Emthip M, Sungnoon D, *et al.* Unexpected antibodies of patients' blood samples sent for testing at NBC, TRCS. *J Hematol Transfus Med* 2010; 20: 255-62. (In Thai)
7. Saipin J, Bejrachandra S, Outrakoolpoon-suk K, Jaiyen B. Anti-f (ce) in a multi-transfused patient: a case report. *Thai J Hematol Transf Med* 2007; 17: 255-6. (In Thai)
8. Nathalang O. Laboratory indications and applications of antibody detection. *J Hematol Transfus Med* 2018; 28: 115-8. (In Thai)
9. Chow PK, Tsoi WC. Antibody against compound antigen ce (f). *JHKMTA* 1997/98; 7: 19-21.
10. Nah H, Shin S, Kim S, Lee E, Kim HO. A case report of anti-f (ce) identified in a patient with pancreatic cancer. *Korean J Blood Transfus* 2016; 27: 174-82. (In Korea)
11. Alharbi A, Batarfi K, Kiseo PD, Saleh JF, Shareefi AA, Nourah AH. Detection of anti-f on a 51-year-old Saudi female. *J Appl Hematol* 2020; 11: 199-203.

12. Ponsen S, Phonimit S, Premprayoon N, Kerdkaewngam K, Tingtoy U. Production of human hybridoma secreting monoclonal antibody against Rh(E) antigen. J Hematol Transfus Med 2019; 29: 83-90. (In Thai)
13. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. Technical Manual. 18th ed. Bethesda, Maryland, USA: American Association of Blood Banks; 2014.
14. The Medical Technology Council. Work manual for Transfusion Science. 1st ed. Bangkok: P. S. Service; 2018. (In Thai)
15. Alzate MA, Manrique LG, Bolanos NI, Duarte M, Coral-Alvarado P, Gonzalez JM. Simultaneous detection of IgG, IgM, IgA complexes and C3d attached to erythrocytes by flow cytometry. Int J Lab Hematol 2015; 37: 382-9.