

นิพนธ์ต้นฉบับ

Anti-I as a Cause of Autoimmune Hemolytic Anemia

เรื่องรอง ชีพลัดยากร, บุญสม ชัยมงคล*, มณฑิชา สกุลวัฒนะ** และ ลัดดา ฟองสถิตย์กุล**

ภาควิชาพยาธิวิทยา, *ศูนย์ศรีพัฒน์, **งานธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ : Anti-I ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีที่ไม่สำคัญเพราะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ โดยมีไตเตอร์น้อยกว่า 64 ที่อุณหภูมิ 4°C น้อยรายที่จะทำให้มีการทำลายเม็ดเลือดแดง **วัตถุประสงค์ :** เพื่อรายงานโรค autoimmune hemolytic anemia (AIHA) ที่มีสาเหตุจาก anti-I จำนวน 1 ราย ผู้ป่วยชายไทย อายุ 61 ปี ซีดี Hb 8.8 g/dL Hct 26% MCV 92 fL MCH 31.1 pg MCHC 33.8% สเมียร์เลือด เม็ดเลือดแดงมี autoagglutination การตรวจหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี standard tube test แปลผลไม่ได้ การตรวจ direct antiglobulin test ที่อุณหภูมิ 37°C พบ C3d เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดง autocontrol ให้ผลบวก การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีเป็น anti-I ไตเตอร์ anti-I ที่อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 37°C มีดังนี้คือ 65536, 512 และ 4 ตามลำดับ การทดสอบซีรัมผู้ป่วยด้วย dithiothreitol พบว่า anti-I เป็น IgM การทำ gentle heat elution ที่อุณหภูมิ 45°C และนำเม็ดเลือดแดงที่ elute แล้วมาตรวจ cell grouping ด้วยวิธี gel test เป็นหมู่ AB heat elution ที่อุณหภูมิ 56°C eluate ให้ผลลบ การทำ cold autoadsorption นำ adsorbed serum มาตรวจ serum grouping พบว่าเป็นหมู่ AB การทำ milk inhibition test น้ำนมสามารถทำปฏิกิริยายับยั้ง anti-I ในซีรัม เม็ดเลือดแดงผู้ป่วยมีการแตกทำลาย ปริมาณ LDH สูง haptoglobin ต่ำ indirect bilirubin สูงเล็กน้อย ปริมาณ IgM สูง ระดับ C4 ต่ำ **สรุป :** พบผู้ป่วย AIHA ที่มี autoanti-I (cold type) ในไตเตอร์ที่สูงมาก ทำให้การตรวจหมู่เลือด ABO แปลผลไม่ได้ ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการควรทำ gentle heat elution และ cold autoadsorption เพื่อให้ทราบหมู่เลือดที่ถูกต้อง การตรวจหาชนิดของแอนติบอดีและการตรวจไตเตอร์ของ anti-I มีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและการวางแผนการรักษาผู้ป่วยต่อไป

Key Words : ● Anti-I ● Autoimmune hemolytic anemia

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2553;20:263-71.

Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) เกิดจากการมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงของตัวเอง (autoantibody) มาทำลายเม็ดเลือดแดงทำให้ผู้ป่วยซีดี AIHA สามารถจำแนกตามลักษณะของ autoantibody ได้เป็น 4 ชนิด คือ warm autoimmune hemolytic anemia (WAIHA), cold agglutinin disease (CAD), mixed-type AIHA และ paroxymal cold hemoglobinuria (PCH) WAIHA เกิดจาก autoantibody ซึ่งเป็น IgG ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เช่น แอนติบอดีของหมู่เลือด Rh¹ CAD เกิดจาก IgM autoantibody ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C และยังสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25-32°C เช่น anti-I, anti-i, anti-I^T และ anti-Pr Mixed-type AIHA เกิดจาก autoantibody ซึ่งเป็น IgG และ IgM ทำปฏิกิริยาที่

ได้รับต้นฉบับ 25 กันยายน 2553 ให้ลงตีพิมพ์ 3 ตุลาคม 2553

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.เรื่องรอง ชีพลัดยากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

e-mail : rocheepsa@mail.med.cmu.ac.th

อุณหภูมิ 4-37°C PCH เกิดจาก IgG autoantibody เป็น biphasic hemolysin จับกับเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิต่ำ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37°C มีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์และทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เช่น anti-P

ผู้ป่วย AIHA ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 70 เป็น warm type² ส่วน cold type พบได้ค่อนข้างน้อย มีรายงาน AIHA ในเด็กที่มีสาเหตุจาก anti-I ในประเทศอิตาลี พบเพียง 20 ราย ในรอบ 20 ปี (ค.ศ. 1983-2003)³ ในประเทศออสเตรเลียพบโรค CAD จาก anti-I จำนวน 1 ราย เป็นเด็กหญิงอายุ 3 ปี ติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* หลังจากได้ยาเคมีบำบัดเพื่อรักษา rhabdomyosarcoma⁴ ในประเทศอิหร่านพบ AIHA จาก anti-I จำนวน 1 ราย เป็นผู้ชายอายุ 49 ปี ซึ่งป่วยเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว⁵ ในประเทศไทยที่มีรายงานพบ AIHA จาก anti-I จำนวน 1 รายที่โรงพยาบาลรามาริบัติ⁶ เป็นเด็กอายุ 15 ปี มาโรงพยาบาลด้วย อาการไข้ ซีดี เหลือง hematocrit 25% จำเป็นต้องได้รับเม็ดเลือดแดง 2 ยูนิต นอกจากนี้มีรายงานผู้ป่วย CAD ที่

โรงพยาบาลศิริราช 1 ราย และที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า 1 ราย⁷ เนื่องจากโรค CAD จาก anti-I มีรายงานการตรวจพบน้อย จึงนำเสนอเป็นรายงาน

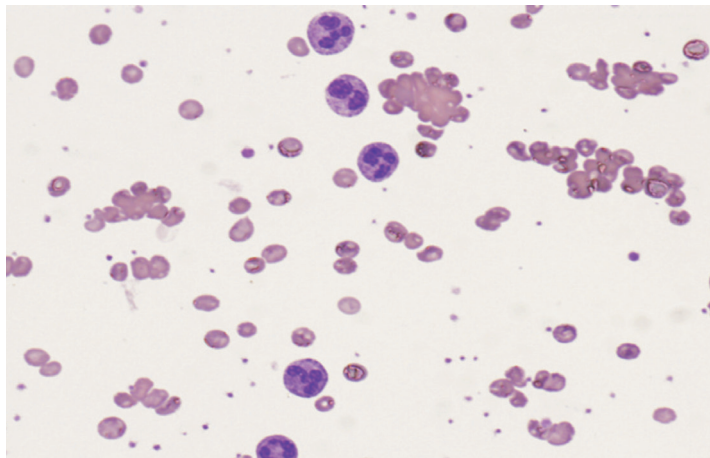
รายงานผู้ป่วย

ผู้ป่วยชายไทย อายุ 61 ปี อาชีพ มัคคุเทศก์ 2 ปีก่อนมาโรงพยาบาล เมื่อสัมผัสอากาศเย็นจะมีอาการเท้าชา ปลายเท้าเขียว ไม่มีไข้ ไม่อ่อนเพลีย ผู้ป่วยได้รับการตรวจที่โรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ วินิจฉัยเป็น AIHA และได้รับการรักษาด้วย prednisolone 1 mg/kg/day เป็นเวลา 1 เดือน แต่อาการไม่ดีขึ้น กลับซีดลง จึงมารักษาต่อที่ศูนย์ศรีพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การตรวจร่างกายแรกรับ อุณหภูมิ 36.7°C ความดันโลหิต 140/80 mmHg ชีพจร 92 /นาที การหายใจ 20 / นาที น้ำหนัก 66 กิโลกรัม ผู้ป่วยซีดปานกลาง ปอดและหัวใจปกติ ตับม้าม ต่อมไทรอยด์ไม่โต ปลายมือและเท้าปกติ ผู้ป่วยไม่เคยรับเลือดมาก่อน ประวัติครอบครัว ไม่มีใครซีดเหมือนผู้ป่วย การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีดังนี้

CBC: Hb 8.8 g/dL Hct 26% WBC 12,100 / μ L (N 51%, L 41%, M 6%, E 1%, B 1%) NRBC 4% platelet count 405,000 / μ L RBC 2.8×10^6 / μ L MCV 92 fL MCH 31.1 pg MCHC 33.8% RDW 18.5% สเมียร์เลือด เม็ดเลือดแดงมี autoagglutination พบ polychromasia และ microspherocyte (รูปที่ 1) การตรวจไขกระดูก: cellularity ปกติ การเจริญเติบโตของเซลล์ระบบเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดปกติ พบ plasma cells น้อยกว่า 5% การตรวจ immunophenotype ของเซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูกด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี ปกติ ไม่พบ clonal B cells การตรวจโครโมโซม: normal male karyotype (46 XY)

การตรวจ blood chemistry: BUN 12 mg/dL creatinine 1.1 mg/dL total protein 7.8 g/dL albumin 4.7 g/dL globulin 3.1 g/dL alkaline phosphatase 108 U/L cholesterol 197 mg/dL AST 62 U/L ALT 157 U/L total bilirubin 3.65 mg/dL direct bilirubin 0.85 mg/dL LDH 634 U/L

A.



B.

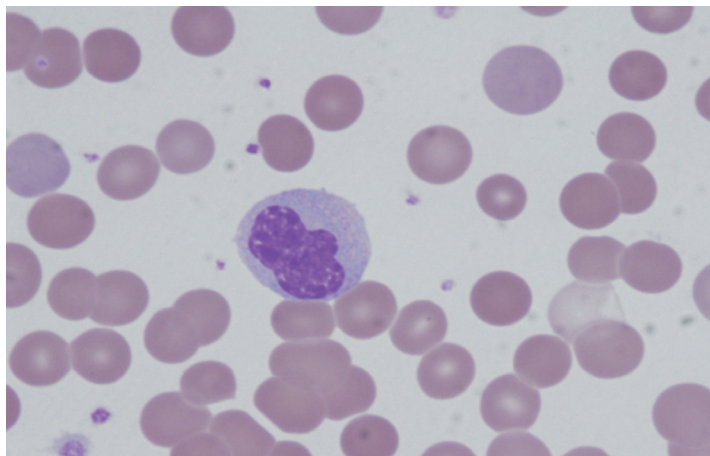


Figure 1 A. Peripheral blood smear showed autoagglutination and red cells clumping (40X)
B. Polychromasia and microspherocytes (100X)

การตรวจทางภูมิคุ้มกัน: haptoglobin <31.5 mg/dL (ค่าปกติ 50-320 mg/dL) IgG 716 mg/dL (ค่าปกติ 800-1,700 mg/dL) IgM 1,070 mg/dL (ค่าปกติ 50-370 mg/dL) IgA 278 mg/dL (ค่าปกติ 85-490 mg/dL) C3c 734 μ g/mL (ค่าปกติ 550-1,200 μ g/mL) C4 <57.8 μ g/mL (ค่าปกติ 100-400 μ g/mL) complement activity 10.8 CAE unit (ค่าปกติ 60-145 CAE unit) ESR 47 mm/hr (ค่าปกติ 0-10 mm/hr)
การตรวจแอนติบอดีต่อ *Mycoplasma pneumoniae*: IgM และ IgG ให้ผลลบ

การตรวจ serum protein electrophoresis: ไม่พบ monoclonal gammopathy

การตรวจปัสสาวะ: urobilinogen negative การตรวจอุจจาระ: ไม่พบพยาธิ ภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติ CT whole abdomen: fatty liver ไม่พบ abdominal lymphadenopathy

การตรวจทางธนาคารเลือด:

1. ตรวจหมู่เลือด ABO ด้วยวิธี standard tube test⁸
2. ตรวจ direct antiglobulin test⁹ โดยใช้ polyspecific antihuman globulin reagent ซึ่งประกอบด้วย anti-IgG และ anti-C3d [Diaclon Coombs (DiaMed, Switzerland)] ด้วยวิธี standard tube test
3. ตรวจกรองแอนติบอดีในซีรัมด้วยวิธี standard tube test¹⁰ โดยนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับ screening cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย
4. ทำ autocontrol โดยนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของตัวเอง
5. ทำ gentle heat elution ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 15 นาที¹¹ นำเม็ดเลือดแดงที่ elute แล้วมาตรวจหมู่เลือด ABO และ RhD ด้วยวิธี gel test [ABD card (DiaMed, Switzerland)]
6. ทำ heat elution ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 10 นาที¹² และนำ eluate มาตรวจหา unexpected antibody
7. ตรวจ direct antiglobulin test ที่อุณหภูมิ 37°C โดยอุ่นเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลืออุ่น¹³ ทดสอบ direct antiglobulin test ด้วยวิธี gel test โดยใช้ monospecific anti-IgG, anti-IgA, anti-

IgM, anti-C3c และ anti-C3d [DC-Screening I (DiaMed, Switzerland)]

8. ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีในซีรัม¹³ โดยนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult (screening cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) เม็ดเลือดแดงจาก cord blood ของทารกแรกเกิดหมู่ O จำนวน 3 ราย (O i cord) เม็ดเลือดแดง A₁ I adult และเม็ดเลือดแดง O I enzyme-treated [เอ็นไซม์ bromelin (DiaMed, Switzerland)]

9. ตรวจไตเตอร์ของ anti-I^{14,15} โดยนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult ที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 37°C

10. นำซีรัมผู้ป่วยมาทดสอบกับ dithiothreitol (Sigma, USA) เพื่อแยกว่า anti-I เป็น IgM หรือ IgG¹⁶

11. ทำ cold autoadsorption¹⁷ นำเม็ดเลือดแดงผู้ป่วยมา treat ด้วย ZZAP reagent โดยใช้เอ็นไซม์ papain ร่วมกับ dithiothreitol นำเม็ดเลือดแดงที่ treat แล้วมาดูดซับ anti-I ในซีรัมผู้ป่วยที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำ adsorbed serum มาทำปฏิกิริยากับ screening cells เพื่อตรวจว่ามี unexpected alloantibody หรือไม่ และนำ adsorbed serum มาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง A₁ cells และ B cells เพื่อตรวจ serum grouping

12. ทำ milk inhibition test¹⁸ นำน้ำนมของหญิงหลังคลอดหมู่ O ปั่นแยกเอาส่วน cream layer ทั้ง และนำมาต้มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อ inactivate เอ็นไซม์ จากนั้นนำน้ำนมที่ต้มแล้วซึ่งมีสาร I มา incubate กับซีรัมผู้ป่วยที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำซีรัมที่ neutralize ด้วยน้ำนมแล้ว มาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult (indicator red cells) เปรียบเทียบกับ control

ผลการศึกษา

การตรวจหมู่เลือด ABO เม็ดเลือดแดงผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 4+ กับน้ำยา monoclonal anti-A, anti-B และ anti-A, B ซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 4+ กับเม็ดเลือดแดง A₁ cells และ B cells (ตารางที่ 1) การตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี standard tube test แปลผลไม่ได้ antibody screen, direct antiglobulin test

Table 1 ABO blood grouping, antibody screen, direct antiglobulin test and cold autoadsorption

Red cell grouping			Serum grouping		Antibody screen	DAT	Auto control*
Anti-A	Anti-B	Anti-A, B	A ₁ cells	B cells			
4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Cold autoadsorption							
Adsorbed serum			0	0	0		

* Neat serum and untreated red cells

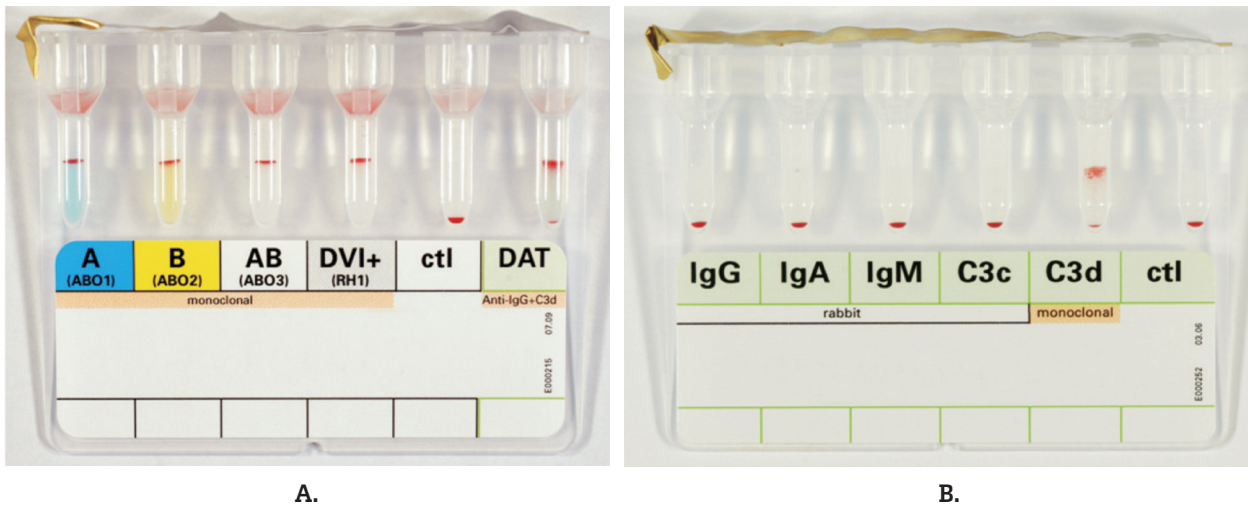


Figure 2 A. AB, RhD positive (after gentle heat elution)
 B. Direct antiglobulin test at 37°C revealed C3d Coated red cells

Table 2 Reactivity of patient’s serum with adult O cells and cord blood

Red cells	Patient’s serum			
	4°C	RT	37°C	AGT
O I adult	4+	4+	2+	4+
O i cord 1	2+	0	0	0
O i cord 2	3+	0	0	0
O i cord 3	3+	0	0	0
A ₁ I adult	4+	4+	2+	weak
Autologous	4+	4+	1+	4+
O I enzyme-treated	4+	4+	4+	4+

Enzyme = bromelin; RT = room temperature; AGT = antiglobulin test

O i adult was not available to be done.

และ autocontrol ให้ผลบวก แสดงว่าผู้ป่วยมี autoantibody จึงทำ gentle heat elution ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แอนติบอดีที่เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดงหลุดออก นำเม็ดเลือดแดงที่ elute แล้ว มาตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี gel test พบเป็นหมู่ AB, RhD positive (รูปที่ 2 ก) การทำ heat elution ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 10 นาที นำ eluate มาทำปฏิกิริยากับ screening cells ให้ผลลบ แสดงว่าไม่มีแอนติบอดีเกาะบนเม็ดเลือดแดง นำเม็ดเลือดแดงผู้ป่วยมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจ direct antiglobulin test โดยวิธี gel test พบ C3d เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 2 ข)

การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีในซีรัมที่อุณหภูมิห้อง ซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 4+ กับเม็ดเลือดแดง O I adult, A₁ I adult, O I enzyme-treated และเม็ดเลือดแดงตัวเอง แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงจาก cord blood ของทารกแรกเกิด (ตารางที่ 2)

ไม่ได้นำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O i adult เนื่องจากไม่สามารถหาเม็ดเลือดแดง O i adult ได้ แต่ที่อุณหภูมิ 4°C ซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 4+ กับเม็ดเลือดแดง O I adult, 2-3+ กับเม็ดเลือดแดง O i cord, 4+ กับเม็ดเลือดแดง A₁ I adult, O I enzyme-treated และเม็ดเลือดแดงตัวเอง และที่อุณหภูมิ 37°C ซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 2+ กับเม็ดเลือดแดง O I adult และ A₁ I adult, 1+ กับเม็ดเลือดแดงตัวเอง, 4+ กับเม็ดเลือดแดง O I enzyme-treated แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O i cord จะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความแรงของการทำปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับเม็ดเลือดแดง O I adult, A₁ I adult และเม็ดเลือดแดงตัวเองลดลง ที่ antiglobulin test ซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยา 4+ กับเม็ดเลือดแดง O I adult, O I enzyme-treated และเม็ดเลือดแดงตัวเอง ทำปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับเม็ดเลือดแดง A₁ I adult แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ O i cord เมื่อเปรียบเทียบการทำ

ปฏิกิริยาระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิดต่างๆ กับลักษณะการทำปฏิกิริยาของ cold autoantibodies (ตารางที่ 3) แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยคือ anti-I

การตรวจไตเตอร์ของ anti-I โดยนำซีรัมผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult ไตเตอร์ anti-I ที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 37°C มีดังนี้คือ 65536, 512 และ 4 ตามลำดับ การทดสอบซีรัมผู้ป่วยด้วย dithiothreitol พบว่า dithiothreitol treated serum ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult (ตารางที่ 4) แสดงว่า dithiothreitol ทำลาย disulfide bond ของ anti-I ดังนั้น anti-I เป็นชนิด IgM การทำ cold autoadsorption พบว่า adsorbed serum ไม่ทำปฏิกิริยากับ screening cells แสดงว่าผู้ป่วยไม่มี unexpected alloantibody (ตารางที่ 1) การตรวจ serum grouping ซ้ำ พบว่า adsorbed serum ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง A₁ cells และ B cells สรุปได้ว่า ผู้ป่วยเป็นหมู่ AB การทำ milk inhibition test สาร I ในน้ำนมสามารถทำปฏิกิริยายับยั้ง anti-I ในซีรัม ทำให้เมื่อ

เติมเม็ดเลือดแดง O I adult ซึ่งเป็น indicator red cells ลงไป จึงไม่เกิดปฏิกิริยา (ตารางที่ 5)

ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยเป็น AIHA (primary CAD) และรักษาด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD20 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังรักษาอาการซีดดีขึ้น ปริมาณฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นจาก Hb 8.8 g/dL Hct 26% เป็น Hb 10.2 g/dL Hct 32% ผู้ป่วยสบายดี และได้ติดตามผู้ป่วยในเวลา 3 เดือนต่อมา ผู้ป่วยไม่ซีด Hb 13 g/dL Hct 38% ไตเตอร์ anti-I ที่อุณหภูมิห้องลดลงจาก 512 เป็น 64 ส่วนไตเตอร์ anti-I ที่อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิ 37°C ไม่เปลี่ยนแปลง

วิจารณ์

หมู่เลือด I ประกอบด้วยแอนติเจน I และ i แอนติเจน I พบในผู้ใหญ่ ส่วนแอนติเจน i พบบน cord blood การแบ่งระบบหมู่เลือดตาม International Society of Blood Transfusion (ISBT) หมู่ I จัดเป็น ISBT No.027 ประกอบด้วยแอนติเจน I

Table 3 Typical relative reactivity patterns of cold autoantibodies¹³

Red cells	Antibody specificity				
	Anti-I	Anti-i	Anti-I ^T	Anti-IH	Anti-Pr
O I adult	+	0/↓	0/↓	+	+
O i cord	0/↓	+	+	↓	+
O i adult	0/↓	+	0/↓	↓	+
A ₁ I adult	+	0/↓	0/↓	↓	+
Autologous	+	0/↓	0/↓	↓	+
O I enzyme-treated	↑	↑	↑	↑	0

+ = reactive; 0 = nonreactive; ↓ = weaker reaction; ↑ = stronger reaction

Table 4 Effect of dithiothreitol on anti-I

Test sample	Reciprocal of serum dilution									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Serum + DTT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Serum + PBS	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	1+	0

DTT = dithiothreitol; PBS = phosphate-buffered saline

Table 5 Milk inhibition test

Test sample	Reciprocal of serum dilution									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Serum + milk	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Serum + PBS	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	1+	1+	0

เพียงชนิดเดียว ส่วนแอนติเจน i นั้น² ถูกจัดอยู่ใน Li collection No.207 แอนติเจน i มีน้ำตาล galactose อยู่ที่ส่วนปลาย (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1-R) โครงสร้างของแอนติเจน i เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง การสร้างแอนติเจน I อาศัยยีน I (*IGnT*) ยีน I อยู่บนแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 ตำแหน่ง 6p34 การมียีน I จะทำให้มีการสร้างเอ็นไซม์ β 1 \rightarrow 6 *N*-acetylglucosaminyltransferase ทำให้มีการเติมน้ำตาล *N*-acetylglucosamine ต่อจากแอนติเจน i เป็นแอนติเจน I แอนติเจน I จึงมีโครงสร้างเป็น branch chain [Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3(Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6)Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1-R] ทารกเริ่มสร้างแอนติเจน I เมื่ออายุมากขึ้นและจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณเท่าผู้ใหญ่เมื่อเด็กอายุ 2 ปี¹ การผ่าเหล่าของยีน I จะทำให้สร้างแอนติเจน I ไม่ได้กลายเป็น i adult¹⁹ i adult ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive และมีความสัมพันธ์กับ congenital cataract แอนติเจน I บนเม็ดเลือดแดงเป็น glycolipid ส่วนสาร I (I substance) ที่พบในสารคัดหลั่งเป็น glycoprotein แอนติเจน I นอกจากจะพบบนเม็ดเลือดแดงแล้วยังพบได้บนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ส่วนสาร I ซึ่งเป็น glycoprotein พบอยู่ในน้ำนม น้ำลาย พลาสมา ปัสสาวะ amniotic fluid และ ovarian cyst fluid²

แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบ I anti-I พบได้ค่อนข้างบ่อยในคนปกติ เป็น IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ 4°C ไตเตอร์น้อยกว่า 64 autoanti-I มีความสำคัญในผู้ป่วย CAD เช่น ผู้ป่วยรายนี้เพราะไตเตอร์สูง สามารถกระตุ้นคอมพลีเมนต์ทาง classical pathway และทำให้มีการทำลายเม็ดเลือดแดง autoanti-I จับกับเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เม็ดเลือดแดงมี autoagglutination อุดตันภายในหลอดเลือด arteriole

บริเวณปลายนิ้วมือ เท้า ใบหู และจมูก²⁰ ซึ่งเห็นได้จากเวลาผู้ป่วยสัมผัสอากาศเย็นจะมีอาการเท้าชา ปลายเท้าเขียว (acrocyanosis) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 37°C autoanti-I หลุดออกจากเม็ดเลือดแดง แต่คอมพลีเมนต์ยังตรึงอยู่ C3b ที่เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดงจะจับ C3b receptor ของ macrophage ในตับ ทำให้มีการทำลายเม็ดเลือดแดงแบบ extravascular hemolysis²¹ (รูปที่ 3) macrophage หลัง ectoenzyme มาย่อยเม็ดเลือดแดง ทำให้ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลง รูปร่างเม็ดเลือดแดงจึงเปลี่ยนแปลงเป็น spherocyte ปฏิกิริยาส่วนใหญ่มักไม่รุนแรงเพราะเม็ดเลือดแดงที่มี C3b เกาะเป็นตัวกระตุ้นอย่างอ่อนสำหรับการเกิด phagocytosis และการทำลายที่ตัดต้องมี C3b จำนวน 500-800 โมเลกุล/RBC เม็ดเลือดแดงที่มี C3b ตรึงอยู่ส่วนใหญ่จึงถูกย่อยโดย C3b inactivator เป็น C3dg และ C3d เนื่องจาก macrophage ไม่มี C3d receptor เม็ดเลือดแดงที่มี C3d และไม่มี IgM autoantibody จึงไหลเวียนกลับสู่กระแสเลือดและมีชีวิตอยู่ต่อไปโดยไม่ถูกทำลาย แต่ผู้ป่วย CAD บางรายที่มี C3b inactivator ผิดปกติ ทำให้เปลี่ยนแปลงเป็น C3d ไม่ได้ ผู้ป่วยกลุ่มนี้เม็ดเลือดแดงจะถูกการทำลายแบบ extravascular hemolysis อย่างรุนแรง หรือผู้ป่วยที่ถูกความเย็นเป็นเวลานาน C3b จะถูกกระตุ้นต่อจนถึง C5-C9 เกิด intravascular hemolysis ผู้ป่วยรายนี้ปริมาณ C3c ปกติ ปริมาณ C4 ต่ำ complement activity ต่ำ แสดงว่า autoanti-I มีการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ในร่างกายมาก การตรวจ CBC พบว่าผู้ป่วยซีด Hb 8.8 g/dL Hct 26% สเมียร์เลือด เม็ดเลือดแดงมี autoagglutination การมี autoagglutination ทำให้ RBC count น้อยกว่าความเป็นจริง²² MCV และ MCHC สูงปลอม RDW กว้างแสดงว่าเม็ดเลือดแดงมีขนาดแตกต่างกันเนื่องจาก polychromasia ขนาดใหญ่ และ microspherocyte

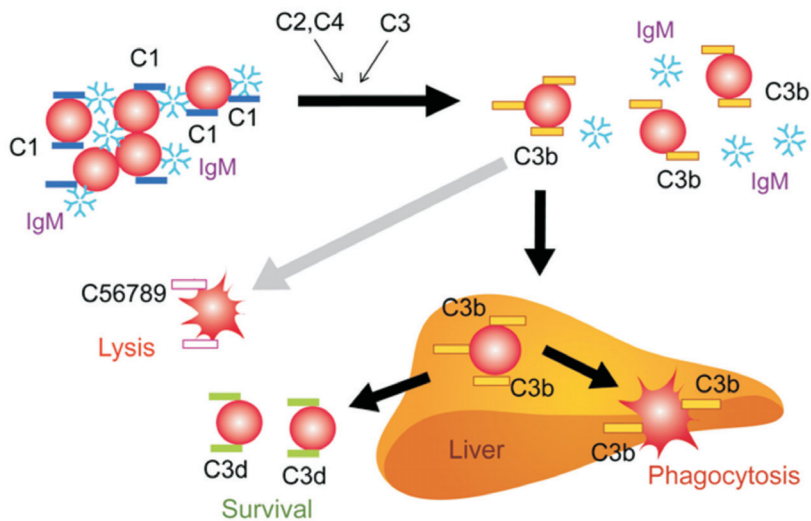


Figure 3 IgM cold agglutinin and complement are essential to pathogenesis of cold agglutinin disease.²¹

ขนาดเล็ก พบ nucleated red cells และ polychromasia แสดงให้เห็นว่าไขกระดูกพยายามสร้างเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ผู้ป่วย CAD ที่มีอาการเรื้อรังส่วนใหญ่มีอายุ 50-80 ปี และมีโรคของ B-cell neoplasm ร่วมด้วย เช่น chronic lymphocytic leukemia และ Waldenstrom macroglobulinemia ทำให้มีการสร้าง IgM-kappa การตรวจไขกระดูกของผู้ป่วยรายนี้ ไม่พบ clonal B cells CT whole abdomen ไม่พบ abdominal lymphadenopathy ตรวจไม่พบมะเร็งที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค ผู้ป่วย CAD ที่มีอาการฉับพลันเกิดภายหลังการติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae*⁴ การที่ *Mycoplasma pneumoniae* กระตุ้นให้สร้าง autoanti-I มีผู้อธิบายไว้ 2 ทฤษฎี²² ทฤษฎีแรกแอนติเจน I บนเม็ดเลือดแดงเป็น receptor ของเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* เชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* จับกับเม็ดเลือดแดงทำให้แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (minor modification) กระตุ้นให้สร้าง autoanti-I ขึ้น ทฤษฎีที่ 2 *Mycoplasma pneumoniae* มีคุณสมบัติคล้ายแอนติเจน I (I-like antigen) กระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีมา cross react กับเม็ดเลือดแดงของตัวเอง autoanti-I ที่พบภายหลังการติดเชื้อเป็น polyclonal IgM ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการไม่รุนแรง พบแอนติบอดีชั่วคราวประมาณ 2-3 สัปดาห์ ผู้ป่วยรายนี้ไม่มีไข้ ภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติ การตรวจแอนติบอดีต่อ *Mycoplasma pneumoniae* IgM และ IgG ให้ผลลบ ผู้ป่วยรายนี้จึงเป็น primary CAD ซึ่งไม่ทราบสาเหตุ

CAD นอกจากจะมีสาเหตุ anti-I แล้วยังเกิดจาก anti-i, anti-I^T และ anti-Pr CAD จาก anti-i มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ Epstein-Barr virus ที่ทำให้เกิดโรค infectious mononucleosis²³ และยังเกิดจากโรค hairy cell leukemia²⁴ anti-i แยกจาก anti-I คือ anti-I จะทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O i cord และ O i adult ส่วน anti-i ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O i cord และ O i adult แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult (ตารางที่ 3) CAD จาก anti-I^T พบน้อย มีรายงานผู้ป่วย CAD ที่มีสาเหตุจาก anti-I^T ซึ่งเป็น immunoblastic sarcoma²⁵ anti-I^T เป็นแอนติบอดีที่อยู่ระหว่างการเปลี่ยน i เป็น I anti-I^T ทำปฏิกิริยาอย่างแรงกับเม็ดเลือดแดง O i cord แต่ทำปฏิกิริยาอ่อนกับเม็ดเลือดแดง O I adult และปฏิกิริยาอ่อนมากกับ O i adult CAD จาก anti-Pr พบน้อยมาก anti-Pr ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I adult, O i cord และ O i adult แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง O I enzyme-treated เนื่องจากเอ็นไซม์ protease หรือ sialidase ทำลาย sialyl group ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของแอนติเจน Pr^{26,27} แอนติบอดีที่เป็นสาเหตุของ CAD พบ anti-I

มากที่สุด รองลงมาคือ anti-i พบ anti-Pr น้อยที่สุด²

ผู้ป่วย CAD มี autoantibody จับอยู่บนเม็ดเลือดแดง ทำให้การตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี standard tube test แปลผลไม่ได้ จำเป็นต้องทำ gentle heat elution เพื่อ elute เอาแอนติบอดีที่เกาะบนเม็ดเลือดแดงหลุดออก ล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลืออุ่น ตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี gel test โดยตรวจแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับ control นำซีรัมผู้ป่วยมาทำ cold autoadsorption นำ adsorbed serum มาตรวจ serum grouping การทำ gentle heat elution ที่อุณหภูมิ 45°C เหมาะสำหรับตรวจแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงเพราะอุณหภูมิ 45°C ไม่ทำลายผิวเม็ดเลือดแดง¹¹ การทำ heat elution ที่อุณหภูมิ 56°C เหมาะสำหรับตรวจแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดง แต่ไม่เหมาะสำหรับตรวจแอนติเจนเพราะอุณหภูมิ 56°C อาจทำลายแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง ผู้ป่วยรายนี้หากจำเป็นต้องรับเม็ดเลือดแดง การทำ crossmatch ระหว่างซีรัมผู้ป่วยกับเม็ดเลือดแดงผู้บริจาค ควรใช้ IgG-specific antihuman globulin reagent¹ และการให้เลือดผู้ป่วยรายนี้จำเป็นต้องใช้ in-line blood warmer เพื่อควบคุมอุณหภูมิเม็ดเลือดแดงที่ให้เป็น 37°C ตลอดเวลา แต่ถ้าไม่มี in-line blood warmer พิจารณาให้เม็ดเลือดแดงเข้าหลอดเลือดดำขนาดใหญ่ขณะร่างกายผู้ป่วยอบอุ่น²²

สรุป

ผู้ป่วยชายไทย อายุ 61 ปี มีอาการเข้าหา ปลายเท้าเขียวเวลาสัมผัสอากาศเย็น ผู้ป่วยซีด Hb 8.8 g/dL Hct 26% สเมียร์เลือด เม็ดเลือดแดงมี autoagglutination การตรวจ direct antiglobulin test ที่อุณหภูมิ 37°C พบ C3d เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดง autocontrol ให้ผลลบ การตรวจแยกชนิดแอนติบอดีเป็น anti-I ไตเตอร์ anti-I ที่อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 37°C มีดังนี้คือ 65536, 512 และ 4 ตามลำดับ เม็ดเลือดแดงผู้ป่วยแตกทำลาย ปริมาณ LDH สูง haptoglobin ต่ำ indirect bilirubin สูงเล็กน้อย ระดับ IgM สูง ระดับ C3c ปกติ C4 ต่ำ การวินิจฉัยโรค primary CAD รักษาด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน CD20 หลังรักษาอาการดีขึ้น ผู้ป่วยสบายดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย ที่ตรวจยืนยัน anti-I และหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา งานปฏิบัติการกลางและชันสูตรโรค คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความร่วมมือต่อการศึกษารั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:499-521.
2. Hamening DM, editor. *Modern blood banking and transfusion practices*. 5th ed. Philadelphia: F.A. Davis, 2005:173-423.
3. Vaglio S, Arista MC, Perrone MP, Tomei G, Testi AM, Coluzzi S, et al. Autoimmune hemolytic anemia in childhood: serologic features in 100 cases. *Transfusion* 2007;47:50-4.
4. Fink FM, Dengg K, Kilga-Nogler S, Schonitzer D, Berger H. Cold haemagglutinin disease complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection in a child under cytotoxic cancer treatment. *Eur J Pediatr* 1992;151:435-7.
5. Pourazar A, Rezaie A, Joshi SR. Auto-immune hemolytic anemia in patient who his serum react with all ABO blood group. *J Res Med Sci* 2004;6:308-11.
6. สุณี สถาปนัสวัสดิการ, เกลิมชัย สืบแสง, บุญลักษณ์ คำอ้อม, พงษ์จันทร์ ทัดถิรัตน์, พิมพ์ เชี่ยวศิลป์. Anti-I autoimmune hemolytic anemia. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2538;5:267-8.
7. วิชัย ประยูรวิวัฒน์, แสงสุรีย์ จูฑา, ถนอมศรี ศรีชัยกุล, บรรณานิการ. ตำราโลหิตวิทยาการวินิจฉัยและการรักษาโรคเลือดที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: นำอักษรการพิมพ์, 2550:215-33.
8. Method 2-2. Determining ABO group of red cells and serum-tube test. In : Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:878-9.
9. Method 3-6. Performing a direct antiglobulin test. In : Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:908-9.
10. Method 3-2-1. Saline indirect antiglobulin test procedure. In: Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:900.
11. Method 2-19. Using gentle heat elution to test red cells with a positive DAT. In : Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:893-4.
12. Method 4-3. Heat elution procedure. In : Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:921.
13. Method 4-6. Determining the specificity of cold-reactive autoagglutinins. In: Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:923-5.
14. Method 3-7. Antibody titration procedure. In : Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:909-11.
15. Method 4-7. Cold agglutinin titer procedure. In: Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:925-6.
16. Method 3-8. Using sulfhydryl reagents to distinguish IgM from IgG antibodies. In: Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:911-3.
17. Method 4-5. Cold autoadsorption procedure. In: Roback JD, editor. *Technical manual*. 16th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks, 2008:922-3.
18. Marsh WL, Nichols ME, Allen FH. Inhibition of anti-I sera by human milk. *Vox Sang* 1970;18:149-54.
19. Lin M, Hou MJ, Yu LC. A novel IGnT allele responsible for the adult i phenotype. *Transfusion* 2006;46:1982-7.
20. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, et al. *Hematology: basic principles and practice*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2009:645-57.
21. Berentsen S, Beiske K, Tjonnford GE. Primary chronic cold agglutinin disease: an update on pathogenesis, clinical features and therapy. *Hematology* 2007;12:361-70.
22. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009:956-77.
23. Mason HM, Arndt PA. A 13-year-old girl with cold agglutinin syndrome caused by anti-i. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:543-5.
24. Mainwaring CJ, Walewska R, Snowden J, Winfield DA, Ng JP, Chan-Lam D, et al. Fatal cold anti-i autoimmune haemolytic anaemia complicating hairy cell leukaemia. *Br J Haematol* 2000;109:641-3.
25. Freedman J, Cheng LF, Murray D, Myers R. An unusual autoimmune hemolytic anemia in a patient with immunoblastic sarcoma. *Am J Hematol* 1983;14:175-84.
26. Konig AL, Schabel A, Sugg U, Brand U, Roelcke D. Autoimmune hemolytic anemia caused by IgG λ -monotypic cold agglutinins of anti-Pr specificity after rubella infection. *Transfusion* 2001;41:488-92.
27. Leo A, Kreft H, Hack H, Kempf T, Roelcke D. Restriction in the repertoire of the immunoglobulin light chain subgroup in pathological cold agglutinins with anti-Pr specificity. *Vox Sang* 2004;86:141-7.

Anti-I as a Cause of Autoimmune Hemolytic Anemia

Ruangrong Cheepsattayakorn, Boonsom Chaimongkol*, Monticha Sakulwattana**
and Ladda Fongsatitkul**

Department of Pathology; *Sriphat Medical Center; **Blood Bank, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Abstract : Anti-I is a common antibody present in the serum of normal healthy individuals. It reacts best at 4°C with a titer less than 64 and is usually not associated with in-vivo red cell destruction. **Objective :** To report an interesting case of autoimmune hemolytic anemia (AIHA) due to anti-I. A 61-year-old man was presented with anemia. The hemoglobin was 8.8 g/dL and hematocrit was 26%. The MCV was 92 fL, MCH was 31.1 pg and MCHC was 33.8%. Peripheral blood smear showed significant autoagglutination and red cells clumping under magnification. Direct antiglobulin test at 37°C revealed C3d coated red cells. Autocontrol was positive. Anti-I was found in his serum with titers of 65536, 512 and 4 at the temperature of 4°C, room temperature and 37°C, respectively. Dithiothreitol treated serum demonstrated that anti-I was IgM. Gentle heat elution at 45°C was done and the eluted red cells was AB. Heat elution at 56°C was performed and the eluate was non reactive. Cold autoadsorption was performed. The adsorbed serum was tested for serum grouping, resulting that he was AB. Milk inhibition test showed that anti-I in serum was inhibited by human milk. Indirect bilirubin was mildly elevated and lactate dehydrogenase was increased reflecting red cell destruction. Serum haptoglobin and C4 level were decreased. The IgM was increased. **Conclusion :** A case of cold-type autoanti-I AIHA was detected. The autoanti-I effected in ABO phenotyping. Gentle heat elution and cold autoadsorption were performed to solve the problem. The high titer of autoanti-I specificity was identified to facilitate the appropriate treatment.

Key Words : ● Anti-I ● Autoimmune hemolytic anemia

J Hematol Transfus Med 2010;20:263-71.

