

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A และ anti-B ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

อุดม ดิ่งต้อย, อัจฉรา ศิริพงษ์ชานูสิทธิ์, สารีกา เมฆฉาย และ ทศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ : ได้ทำการศึกษาน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A และ anti-B ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ lot ปัจจุบัน (C9) และ anti-A ที่ผลิตขึ้นจาก clone ใหม่ (C10) เทียบกับของบริษัทจำนวน 8 บริษัท (C1-C8) เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการตรวจหมู่โลหิต ABO โดยการศึกษากำลัง (potency) ความเร็ว (avidity) ความจำเพาะ (specificity) และความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup A, B และ AB พบว่าน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ให้ผลความแรงและความเร็วได้มาตรฐาน เทียบเท่าและดีกว่าบางบริษัท ส่วนความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup พบว่า anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ และทุกบริษัท สามารถตรวจเซลล์ subgroup A ได้ 78 ตัวอย่างจาก 81 ตัวอย่าง เป็น A_2 12 ราย A_2B 17 ราย A_3B 31 ราย ส่วน A_3 18 ราย น้ำยา anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) ตรวจได้ 17 ราย และ A_{Hm} จำนวน 3 ราย น้ำยาของทุกบริษัทไม่สามารถตรวจได้ ส่วนน้ำยา anti-B สามารถตรวจพบเซลล์ subgroup B ได้ 18 รายจากทั้งหมด 23 ราย มี subgroup B 1 ราย ที่ 5 บริษัทสามารถตรวจพบได้ (C1, C3, C4, C8 และ C9) จำนวน 1 ราย มีเพียง 2 บริษัทสามารถตรวจได้ (C4 และ C9) อีก 1 ราย มีเพียงบริษัท C4 สามารถตรวจได้ที่ $4^{\circ} C$ 30 นาที โดยให้ปฏิกิริยาเป็น very weak positive มี 1 รายเป็น subgroup A_1B_3 ทุกบริษัทสามารถตรวจพบได้ และได้ทำการทดสอบกับ B_{Hm} 4 ราย พบว่ามี 1 รายที่ทุกบริษัทสามารถตรวจพบได้ อีก 1 รายมีเพียงบริษัท C4 สามารถตรวจได้ และ 2 ราย ทุกบริษัทไม่สามารถตรวจพบได้ น้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ยังคงมีความแรงได้มาตรฐาน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $2-8^{\circ} C$ เป็นระยะเวลา 24 เดือน จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือดของโรงพยาบาล

Key Words : ● โมโนโคลนัล anti-A ● โมโนโคลนัล anti-B

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2553;20:19-25.

บทนำ

ปัจจุบันน้ำยาตรวจหมู่โลหิตระบบ ABO เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีซึ่งถูกสร้างขึ้นในหลอดทดลองโดยเทคนิค "hybridoma" ซึ่งอาศัยการ hybridization หรือ fusion ของเซลล์ lymphocyte ที่ผลิตแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็งทำให้เกิดเป็นเซลล์ hybridoma ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A และ anti-B สามารถตรวจเซลล์ A เซลล์ B และเซลล์ A_1B ได้เป็นอย่างดี รวมทั้งใช้ทดสอบหมู่โลหิต ABO ที่มี weak antigen (subgroup) ได้ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพดี¹⁻⁴ ศูนย์บริการโลหิตฯ ได้ทำการผลิตโมโนโคลนัล anti-A, anti-B และ anti-A,B เป็นผลสำเร็จ⁵⁻⁷

ได้จำหน่ายให้แก่โรงพยาบาลต่างๆ ทั่วประเทศมาจนถึงปัจจุบันเป็นเวลากว่า 15 ปี ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพของน้ำยา anti-A ยังมีคุณภาพดีกว่าบางบริษัท ทั้งด้านความแรง ความเร็วและความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup⁸ นอกจากนี้แอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีความแรงค่อนข้างต่ำเมื่อนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตจึงต้องทำการ concentrate เพื่อให้มีความแรงเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิต anti-A สูง ส่วน anti-B พบว่ามีคุณภาพดีเทียบเท่ากับบริษัท ขณะนี้ศูนย์บริการโลหิตฯ ได้ทำการพัฒนาการผลิตโมโนโคลนัล anti-A โคลนใหม่ ($3C_4$) ที่มีประสิทธิภาพดี ทั้งในด้านความแรง ความเร็วในการทำปฏิกิริยาและความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup ต่างๆ ได้ดี⁹ โดยไม่ต้องทำการ concentrate ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงถึงร้อยละ 25 และได้นำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A แล้ว การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A และ anti-B ที่ศูนย์บริการ

ได้รับต้นฉบับ 26 พฤศจิกายน 2552 ให้ลงตีพิมพ์ 16 ธันวาคม 2552

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางอัจฉรา ศิริพงษ์ชานูสิทธิ์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร. 10330

โลหิตแห่งชาติ ผลิตจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันกับของบริษัทต่างๆ ที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดขณะนี้ ทั้งด้านความแรง ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยารวมทั้งความจำเพาะและความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup ของหมู่โลหิต A และ B เพื่อความมั่นใจว่านำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ มีคุณภาพได้มาตรฐานและเหมาะสมที่จะใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือด

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างโลหิต

CPD blood หมู่ A, B และ A₁B จากผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตฯ ซึ่งผ่านการตรวจใน routine Lab ด้วยเครื่อง Olympus PK 7200 ทั้งด้าน cell grouping และ serum grouping โดยใช้ นำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A anti-B, anti-A₁, anti-A₁B และเซลล์มาตรฐาน (A-cell, B-cell และ O-cell) ของศูนย์บริการโลหิตฯ ในกรณีเป็นโลหิตหมู่ย่อย (subgroup) ได้ทำการตรวจซ้ำด้วยวิธีหลอดทดลอง (conventional tube test) และเทคนิคพิเศษอื่นๆ¹⁰ ได้แก่ absorption elution หรือ saliva test เพื่อให้ทราบหมู่โลหิตที่แน่นอนได้แก่

- 1.1 ตัวอย่างโลหิต หมู่ A, B และ A₁B อย่างละ 20 ราย
- 1.2 ตัวอย่างโลหิตที่เป็น subgroup ได้แก่
 - 1.2.1 subgroup A จำนวน 33 รายเป็น A₂ 12 ราย A₃ 18 ราย และ A_{Hm} 3 ราย
 - 1.2.2 subgroup B จำนวน 22 รายเป็น B₃ 18 ราย และ B_{Hm} 4 ราย
 - 1.2.3 subgroup AB จำนวน 49 รายเป็น A₂B 17 ราย A₃B 31 ราย และ A₁B₃ 1 ราย

2. เซลล์สำหรับทดสอบ

2.1 เซลล์สำหรับทดสอบความแรง (potency test) เตรียมจากหมู่เดียวกัน อย่างละ 2 รายรวมกันในปริมาณเท่ากันและเตรียมที่ความเข้มข้น 2% ใน 0.9% NaCl (normal saline)

- สำหรับ anti-A ทดสอบกับเซลล์ A₁ และ A₂B
- สำหรับ anti-B ทดสอบกับเซลล์ B และ A₁B

2.2 เซลล์สำหรับทดสอบความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (avidity time) ใช้ whole blood มีความเข้มข้น 30-45% ในพลาสมา¹¹

- สำหรับ anti-A ทดสอบกับเซลล์ A₁ 20 ราย และเซลล์ A₂B 17 ราย
- สำหรับ anti-B ทดสอบกับเซลล์ B และ A₁B อย่างละ 20 ราย

2.3 เซลล์สำหรับทดสอบความจำเพาะ (specificity test) และความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup เตรียมเป็นเซลล์

เข้มข้น 3% ในพลาสมา

- สำหรับ anti-A ทดสอบกับเซลล์ A₁, A₂, A₂B, A₃ และ A_{Hm}
- สำหรับ anti-B ทดสอบกับเซลล์ B, A₁B, B₃ และ B_{Hm}

3. นำยาตรวจหมู่โลหิตที่ใช้ในการทดสอบ

3.1 โมโนโคลนัล anti-A

C1	Commercial 1	AABB	Lot A-0805
C2	Commercial 2	Biotest	Lot 1211203
C3	Commercial 3	CSL	Batch No. 026127801
C4	Commercial 4	Diagast	Lot 312000
C5	Commercial 5	Diamed	Lot 10290.26.10
C6	Commercial 6	Newmarket	Lot 416105
C7	Commercial 7	Ortho	Lot BAA562A2
C8	Commercial 8	Tulip	Lot sep2004
C9*	Commercial 9	NBC	Lot 48011
C10**	Commercial 10	NBC	Lot 49010

3.2 โมโนโคลนัล anti-B

C1	Commercial 1	AABB	Lot B-0804
C2	Commercial 2	Biotest	Lot 1110204
C3	Commercial 3	CSL	Batch No. 026627701
C4	Commercial 4	Diagast	Lot 05400
C5	Commercial 5	Diamed	Lot 10300.32.30
C6	Commercial 6	Newmarket	Lot 411202
C7	Commercial 7	Ortho	Lot BBB755A
C8	Commercial 8	Tulip	Lot oct 2004
C9*	Commercial 9	NBC	Lot 48011

หมายเหตุ * เป็นนำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตฯ

** เป็นนำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A ที่ศูนย์บริการโลหิตฯ ผลิตจากแอนติบอดี โคลนใหม่

วิธีการทดสอบ

1. ทดสอบความแรงของนำยาโมโนโคลนัล anti-A และ anti-B (potency test)¹² โดยทำ two-fold dilution ด้วย 0.9 % NaCl (normal saline) แล้วนำนำยาที่เจือจางแล้ว dilution ต่างๆ มา dilution ละ 100 μ l ทำปฏิกิริยากับเซลล์ทดสอบข้อ 2.1 เซลล์ละ 100 μ l ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที บั่นอ่าน 3,400 รอบ/นาที นาน 15 วินาที อ่านผลความแรงเป็น titer ที่ dilution สูงสุดที่เกิดปฏิกิริยาให้เห็นด้วยตาเปล่ารวมทั้งอ่านความแรงเป็น score
2. ทดสอบความแรงของการเกิดปฏิกิริยาด้วย slide test¹³

ตามใบกำกับนํ้ายาของบริษัทโดย หยด whole blood 1 หยดในข้อ 2.2 ลงบน slide แล้วหยดนํ้ายา anti-A หรือ anti-B 1 หยด ลงบน slide บริเวณใกล้ๆ กัน คนให้เข้ากัน จับเวลา ตั้งแต่เริ่มคนจนเกิดการจับกลุ่มให้เห็นเป็น avidity time และอ่านความแรงเมื่อครบ 2 นาที เป็น 1⁺ 2⁺ 3⁺ และ 4⁺

3. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) และความ สามารถในการตรวจเซลล์ subgroup โดยให้ทำปฏิกิริยากับเซลล์ต่างๆ ตามข้อ 2.3 ซึ่งทำการทดสอบโดยหยด anti-A หรือ anti-B 1 หยด กับ 3% เซลล์ 1 หยด ลงในหลอดทดลอง บันทึกลง 3,400 รอบ/นาที นาน 15 วินาที อ่านความแรงของปฏิกิริยาเป็น W 1⁺ 2⁺ 3⁺ 4⁺ และ O เมื่อให้ผลเป็นลบ และ ในกรณีนี้ให้ผลเป็น mixed field ให้รายงานผลเป็น W^{mf} 1⁺ 2⁺ 3⁺ 4⁺ และ 4⁺

4. ทดสอบความคงทนของนํ้ายา ในด้านความแรง (potency test) ของนํ้ายา anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ เทียบกับบริษัท Diamed ที่เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C และจำลองการใช้งานจริงที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง/วัน เป็นระยะเวลา 24 เดือน ซึ่งทำการศึกษาทุกๆ 6 เดือนตามวิธีการทดสอบข้อ 1

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1a แสดงความแรงของนํ้ายาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A ทั้ง 10 ตัวอย่าง พบว่านํ้ายาของศูนย์บริการโลหิต (C9 และ C10) ให้ผลความแรง 1:1024 score รวม 113 กับเซลล์ A₁ ให้ผลความแรงกับเซลล์ A₂B 1:256 และ 1:512 score รวม 76 และ 98 บริษัท C4 ให้ผลความแรงกับเซลล์ A₁ 1:2048 score รวม 119 กับเซลล์ A₂B เท่ากับ 1:1024 score รวม 108

ตารางที่ 1b แสดงความแรงของโมโนโคลนัล anti-B 9 ตัวอย่าง เมื่อทำปฏิกิริยากับเซลล์ B นํ้ายา anti-B ของศูนย์บริการโลหิต (C9) และ บริษัท C4 ให้ผลความแรง 1:1024 score รวม 108 เท่ากัน ปฏิกิริยากับเซลล์ A₁B ให้ผลความแรง 1:512 score รวม 102 และ 104

ตารางที่ 2a แสดงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาให้เห็นเมื่อ anti-A ทำปฏิกิริยากับเซลล์ A₁ เซลล์ A₂ และเซลล์ A₂B พบว่ากับเซลล์ A₁ โมโนโคลนัล anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9 และ C10) เกิดปฏิกิริยาให้เห็นเฉลี่ยภายใน 1.10 และ 1.03 วินาทีตามลำดับกับเซลล์ A₂ ภายใน 2.46 และ 1.22 วินาที กับเซลล์ A₂B ภายใน 2.68 และ 1.22 วินาที ทุกบริษัทเกิดปฏิกิริยาให้เห็นภายใน 1-3.27 วินาทีให้ผลความแรง 4+ กับเซลล์ A₁ 3-4+ กับเซลล์ A₂ และ 2-3+ กับเซลล์ A₂B

ตารางที่ 2b แสดงเวลาในการเกิดปฏิกิริยาให้เห็นเมื่อ anti-B ทำปฏิกิริยากับเซลล์ B และ เซลล์ A₁B พบว่าบริษัทนํ้ายา anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) เกิดปฏิกิริยาให้เห็นภายใน 1.02 วินาที กับเซลล์ A₁B 1.13 วินาที และทุกบริษัทเกิดปฏิกิริยาให้เห็นภายใน 1-1.27 วินาที ให้ผลความแรง 4+ กับเซลล์ B และ A₁B

ตารางที่ 3a แสดงความจำเพาะของนํ้ายา monoclonal anti-A กับ subgroup A จำนวน 81 ราย พบว่าทุกบริษัทรวมทั้งของศูนย์บริการโลหิตฯ ตรวจได้ 78 รายโดย C1-C10 สามารถตรวจพบเซลล์ A₂ ได้ 12 ราย A₂B 17 ราย A₃B 31 ราย และ A₃ 18 ราย ซึ่งมี 1 ราย ที่นํ้ายา anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) ไม่สามารถตรวจได้ส่วนเซลล์ A_{Hm} 3 รายทุกบริษัทรวมทั้งที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตฯ (C10) ไม่สามารถตรวจได้

ตารางที่ 3b แสดงความจำเพาะของนํ้ายาโมโนโคลนัล anti-B กับเซลล์ subgroup B จำนวน 23 ราย (B₃ 18 ราย เซลล์ A₁B₃ 1 ราย และ B_{Hm} 4 ราย) ผลการตรวจพบว่า นํ้ายา anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) สามารถตรวจได้ 19 ราย บริษัท C4 ตรวจได้ 21 ราย บริษัท C1, C3 และ C8 ตรวจได้ 18 ราย บริษัท C2, C5, C6 และ C7 ตรวจได้ 17 ราย เซลล์ B_{Hm} 4 ราย บริษัท C4 ตรวจได้ 2 ราย ทุกบริษัท (C1-C10) ตรวจได้ 1 ราย และอีก 2 ตัวอย่างทุกบริษัทไม่สามารถตรวจได้

ตารางที่ 4a แสดงผลการศึกษาความคงทน (stability) ของนํ้ายาตรวจหมู่โลหิต anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ เทียบกับของบริษัท Diamed พบว่าในเดือนที่ 24 ที่อุณหภูมิ 2-8°C นํ้ายา anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ ให้ผลความแรงกับเซลล์ A และ A₂B เท่ากับ 1:1024 และ 1:128 score รวม 104 และ 79 บริษัท Diamed กับเซลล์ A₁ และ A₂B 1:1024 score รวม 107 และ 80 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่านํ้ายา anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ กับเซลล์ A₁ และ A₂B 1:1024 และ 1:128 score รวม 104, 72 บริษัท Diamed กับเซลล์ A₁ และ A₂B เท่ากับ 1:1024 และ 1:128 score รวม 106 และ 76

ตารางที่ 4b แสดงผลการศึกษาความคงทน (stability) ของนํ้ายาตรวจหมู่โลหิต anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ เทียบกับของบริษัท Diamed พบว่าในเดือนที่ 24 ที่อุณหภูมิ 2-8°C นํ้ายา anti-B ของ ศูนย์บริการโลหิตฯ ให้ผลความแรงกับเซลล์ B และ A₁B 1:1024 score รวม 110 และ 105 บริษัท Diamed กับเซลล์ B และ A₁B 1:1024 score รวม 110 และ 111 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่านํ้ายา anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ กับเซลล์ B และ A₁B เท่ากับ 1:1024 score รวม 108 และ 103 บริษัท Diamed กับเซลล์ B และ A₁B 1:1024 score รวม 110 และ 108

ตารางที่ 1a Comparison of potency between NBC monoclonal anti-A (C9 and C10) and commercial monoclonal anti-A (C1-C8)

cells	commercials	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
A ₁	Titer	1024	1024	1024	2048	512	256	1024	512	1024	1024
	score	114	113	116	119	103	94	115	108	113	113
A ₂ B	Titer	256	512	256	1024	256	128	256	256	256	512
	score	82	96	82	108	85	75	95	85	76	98

ตารางที่ 1b Comparison of potency between NBC monoclonal anti-B (C9) and commercial monoclonal anti-B (C1-C8)

cells	commercials	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
B	Titer	512	512	512	1024	512	256	512	512	1024
	score	97	103	97	108	99	93	105	93	108
A ₁ B	Titer	256	256	256	512	256	128	256	128	512
	score	88	94	90	102	94	84	96	81	104

ตารางที่ 2a Comparison of avidity time (second) between NBC monoclonal anti-A and commercial monoclonal anti-A

Commercials Cells	Reaction grade	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
A ₁	4+	1.08	1.01	1.02	1.08	1.11	2.52	1.00	1.08	1.10	1.03
A ₂	3- 4+	1.76	1.16	1.16	1.08	1.35	3.70	1.60	2.01	2.46	1.12
A ₂ B	2- 3+	2.30	1.23	1.26	1.12	1.40	3.27	1.87	2.21	2.68	1.22

ตารางที่ 2b Comparison of avidity time (second) between NBC monoclonal anti-B and commercial monoclonal anti-B

Commercials Cells	Reaction grade	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
B	4+	1.10	1.04	1.02	1.00	1.14	1.18	1.14	1.20	1.02
A ₁ B	4+	1.17	1.18	1.15	1.10	1.33	1.61	1.20	1.27	1.13

ตารางที่ 3a Comparison of Specificity between NBC monoclonal anti-A and commercial monoclonal anti-A with subgroup A

Commercials Cell	Reaction grade	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
A ₂ (n=12)	4+	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
A ₂ B (n=17)	4+	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
A ₃ (n=18)	w-4+mf	18	18	18	18	18	18	18	18	17	18
A ₃ B (n=31)	w-4+mf	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
A _{Hm} (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 3b Comparison of Specificity between NBC monoclonal anti-B and commercial monoclonal anti-B with subgroup B

Cell \ Commercials	Reaction grade	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
B ₃ (n=18)	w-3+mf	16	15	16	18*	15	15	15	16	17
A ₁ B ₃ (n=1)	w-1+mf	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B _{Hm} (n=4)	w (micro)	1	1	1	2**	1	1	1	1	1

* very weak reaction at 4°C after 30 minutes

** Very weak reaction with microscope

ตารางที่ 4a Comparison between NBC monoclonal anti-A and commercial diaclone anti-A (Diamed) with 3% A₁ and B cell suspension at different temperature.

Storage temp	Cell	Monoclonal anti-A (NBC)								Monoclonal anti-A (Diamed)							
		Period of storage (month)								Period of storage (month)							
		6		12		18		24		6		12		18		24	
		T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
2-8°C	A	1024	103	1024	105	1024	104	1024	104	1024	108	1024	108	1024	105	1024	107
	A ₂	256	90	256	82	256	85	128	79	128	96	256	88	256	85	128	80
RT	A	1024	105	1024	103	1024	100	1024	104	1024	103	1024	103	1024	105	1024	106
	A ₂	128	85	256	85	256	87	128	72	128	80	1028	84	256	90	128	76

ตารางที่ 4b Comparison between NBC monoclonal anti-B and commercial diaclone anti-B (Diamed) with 3% B and A₁B cell suspension at different temperature.

Storage temp.	Cell	Monoclonal anti-B (NBC)								Monoclonal anti-B (diamed)							
		Period of storage (month)								Period of storage (month)							
		6		12		18		24		6		12		18		24	
		T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
2-8 ° C	B	1024	113	1024	110	1024	106	1024	110	1024	115	1024	112	1024	108	1024	110
	A ₁ B	1024	112	1024	108	1024	103	1024	105	1024	114	1024	113	1024	110	1024	111
RT	B	1024	110	1024	112	1024	106	1024	108	1024	112	1024	110	1024	107	1024	110
	A ₁ B	1024	104	1024	107	1024	107	1024	103	1024	106	1024	102	1024	105	1024	108

RT = Room temperature; T = Titer; S = score

วิจารณ์/สรุป

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำยาตรวจหามุโโลหิตโมโนโคลนัล anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) และโมโนโคลนัล anti-A ที่ศูนย์บริการโลหิตฯ ที่ผลิตจาก anti-A โคลนใหม่ (C10) กับน้ำยาของบริษัททั้ง 8 บริษัท (C1-C8) จะเห็นได้ว่าน้ำยาตรวจหามุโโลหิต anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ และของบริษัท (C1-C8) มีคุณภาพได้มาตรฐานสากล ทั้งด้านความแรง ความเร็ว และความจำเพาะ โดยผลของแต่ละตัวอย่างอาจ

แตกต่างกันไปบ้างเนื่องจากโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละบริษัทผลิตจากโมโนโคลนที่มีความแรงและความจำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆกัน จากผลการทดสอบตารางที่ 1a จะเห็นได้ว่า น้ำยาตรวจหามุโโลหิต anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ ซึ่งผลิตจากแอนติบอดีโคลนใหม่ (C10) ให้ผลความแรงดีกว่าหรือเทียบเท่ากับบางบริษัท และดีกว่าน้ำยา anti-A Lot เดิมของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) โดยให้ผลความแรง 1:1024 score รวม 113 กับเซลล์ A₁ และ 1:512 score รวม 98 กับเซลล์ A₂ ส่วนความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา

(avidity time) นั้น anti-A ของศูนย์บริการโลหิตฯ (C10) แสดงปฏิกิริยาจับกลุ่มให้เห็นเฉลี่ยภายใน 1-2 วินาที ซึ่งทุกบริษัทให้ผลการจับกลุ่มให้เห็นเฉลี่ยภายในเวลา 1-4 วินาทีเท่านั้น ดังตารางที่ 2a ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด ส่วนด้านความแรงในการเกิดปฏิกิริยาบน slide (slide test) ทุกบริษัทให้ผลใกล้เคียงกัน คือให้ปฏิกิริยาเฉลี่ย 4+ กับเซลล์ A_1 3-4+ กับเซลล์ A_2 และ 2-3+ กับเซลล์ A_2B อย่างไรก็ตามน้ำยาตรวจหมู่โลหิตทุกตัวอย่างสามารถตรวจหาหมู่โลหิตโดยวิธี slide test ได้ถูกต้องแม่นยำเช่นเดียวกัน ส่วนความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup A_3 จำนวน 18 ราย และเซลล์ A_3B 31 ราย น้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตฯ (C10) สามารถตรวจเซลล์ A_3 ได้ทั้ง 18 ราย เช่นเดียวกับบริษัทอื่นๆ มี 1 รายที่น้ำยาของศูนย์บริการโลหิตฯ (C9) ไม่สามารถตรวจได้ ซึ่งในขณะนั้นยังจำเป็นต้องใช้ anti-A B ในการตรวจยืนยันผลการทำ cell grouping⁸ เนื่องจากตัวอย่างนี้เป็นเซลล์ที่มีแอนติเจนอ่อนมาก ให้ผลการตรวจเป็น very weak positive ส่วนเซลล์ A_3B 31 ตัวอย่างนั้น น้ำยาตรวจหมู่โลหิตทุกบริษัทสามารถตรวจได้ และมี 3 ตัวอย่างเป็น A_{Hm} ที่ผ่านการตรวจทาง saliva test แล้ว ทุกบริษัทรวมทั้งที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตฯ (C9, C10) ไม่สามารถตรวจได้เช่นเดียวกัน ส่วน anti-B (ตารางที่ 1b) จะเห็นได้ว่าในด้านความแรง anti-B ของศูนย์ บริการโลหิตฯ C9 และบริษัท C4 ให้ผลความแรงเทียบเท่าหรือดีกว่าบริษัทอื่น คือความแรงกับเซลล์ B คือ 1:1024 score รวม 108 กับเซลล์ A_1B เท่ากับ 1:512 score รวม 104 และ 102 ส่วนความเร็วในการเกิดปฏิกิริยานั้นอยู่ภายในเวลา 1.02 วินาทีกับเซลล์ B และ 1.13 วินาทีกับเซลล์ A_1B ซึ่งค่าเฉลี่ยของบริษัทต่างๆ อยู่ในช่วง 1.1-1.6 วินาที (ตารางที่ 2b) และให้ผลของปฏิกิริยาเป็น 4+ กับเซลล์ B และ A_1B ส่วนความสามารถในการตรวจเซลล์ subgroup ดังตารางที่ 3b มีความแตกต่างกันไป โดยหมู่ B_3 จำนวน 18 ราย น้ำยา anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ สามารถตรวจได้ 17 ราย อีก 1 ราย มีเพียง บริษัท C4 เท่านั้นที่สามารถตรวจได้ทั้งหมด ส่วนบริษัท C2, C5, C6 และ C7 ตรวจได้เพียง 15 ราย ส่วนเซลล์ A_1B_3 1 รายทุกบริษัทรวมทั้งที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตฯ สามารถตรวจได้เช่นเดียวกัน และเซลล์ B_{Hm} 4 รายบริษัท C4 สามารถตรวจได้ 2 รายโดยให้ผลเป็น weak positive บริษัท C1-C9 ตรวจได้ 1 ราย ที่เหลืออีก 2 รายทุกบริษัทไม่สามารถตรวจได้จากผลการตรวจเซลล์ subgroup A และ B จะเห็นได้ว่าถึงแม้โมโนโคลนัลแอนติบอดีได้ถูกพัฒนาให้ตรวจเซลล์ที่มีแอนติเจนอ่อนๆได้ แต่ยังคงมีความสามารถในการตรวจแตกต่างกัน¹⁴ ดังนั้นการทดสอบหมู่โลหิต ABO จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจ

ทั้ง cell grouping และ serum grouping¹⁵ เป็นการยืนยันผลการตรวจเพื่อลดข้อผิดพลาดจากการตรวจ subgroup ของน้ำยาบางบริษัทที่ไม่สามารถตรวจพบทาง cell grouping ได้ ส่วนความคงทนของน้ำยา (ตารางที่ 4a, 4b) เมื่อเทียบกับของบริษัท Diamed โดยเก็บที่ 2-8°C และ จำลองการใช้ที่อุณหภูมิห้อง (8 ชั่วโมง/วัน) ที่ระยะเวลา 6, 12, 18 และ 24 เดือน ด้านความแรงพบว่า ในเดือนที่ 24 anti-A และ anti-B ทั้งสองบริษัทยังคงมีความแรงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานแม้จะหมดอายุมาเป็นเวลา 6 เดือนแล้วก็ตาม จึงสามารถกล่าวได้ว่าน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตฯ ที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีประสิทธิภาพดี ทั้งในด้านความแรง ความเร็วและความจำเพาะ จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือดของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- Majdic O, Knapp W, Vetterlim M et al. Hybridomas secreting monoclonal antibodies to human group A erythrocytes. *Immunobiology* 4979;156:226-7.
- Voak D, sack S, Alderson T, et al. Monoclonal anti-A from hybridoma myeloma : evaluation As a blood grouping reagent. *Vox Sang* 1980;39:134-40.
- Sack S, Lennox E. Monoclonal anti-B a new blood typing reagent. *Vox sang* 1981;40:99-140
- Voak D, Lennox E Sack S, Miltstien C, Darnborough J. Monoclonal anti-A anti-B : development as cost effective reagent. *Med Lab Sci* 1982;323.9:109-22.
- สร้อยสวางค์ พิกุลสด, รัชณี พลเกียรติ, กัญญ์ชลา อุทิศ, และ จินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิค : I การเปรียบเทียบการกระตุ้นหนูทดลองในการผลิตแอนติ-บี ด้วยปริมาณและชนิดของแอนติเจนต่างๆ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 1991;1:299-307.
- สร้อยสวางค์ พิกุลสด, รัชณี พลเกียรติ, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ตั้งต้อย และ จินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิค : II การศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บีชนิดโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่เปรียบเทียบกับน้ำยาชนิดโมโนโคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัลของศูนย์ฯ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 1992; 2:295-302.
- สร้อยสวางค์ พิกุลสด, รัชณี พลเกียรติ, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ตั้งต้อย และจินตนา ทับรอด การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอ โดยการใช้ไฮบริโดมาเทคนิคของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 1992;4:373-81
- จินตนา ทับรอด, รัชณี มีสุนทร, ปราณีย์ ศิริสมบุญ, สร้อยสวางค์ พิกุลสด ประสิทธิภาพน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-เอ แอนติ-บี และแอนติ-เอ, บี ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 1995;3:180-5.

9. อุดม ตั้งต้อย, สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร, อัจฉรา ศิริพงษ์ขานุสิทธิ์, สารีกา เมฆฉาย การพัฒนาผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยวารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 2008;18:11-9.
10. Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks 2005:731-5.
11. Guidelines For The Blood Transfusion Service in the United Kingdom 7th Edition 2005: 169.
12. Brecher ME, editor. Technical manual. 15th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks 2005:761-4
13. Oriol R, Samuelsson BE, Messeter L. ABO Antibodies serological behavior and Immunochemical characterization. J Immunogenetics 1990;17:279-99.
14. เรืองรอง ชีพสัตยากร, ลัดดา ฟองสถิตกุล, อมรัตน์ ร่มพฤษ และคณะ The B weak Phenotype in Thai Family. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 2545;2:77-89.
15. พิมล เชี่ยวศิลป์ พ.บ., สุณี สถาบันสวัสดิการ วท.บ., เฉลิมชัย สืบแสง วท.บ. ความสำคัญของการทำ serum grouping ในการตรวจหมู่เลือด ABO วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์การบริการโลหิต 2535;2:163-5.

Evaluation of monoclonal anti-A and anti-B antibodies produced by National Blood Center, Thai Red Cross Society

Achara Siripongsanusit, Sarika Makechay, Udom Tingtoy and Tassanee Sakuldamrongpanich

National Blood Center, Thai Red Cross Society

Abstract: Two lots of anti-A and one lot of anti-B monoclonal antibodies produced by Thai Red Cross Society were used for ABO blood grouping and compared to eight commercial reagents in order to evaluate their efficiencies. The potency, avidity, specificity and ability of detecting A, B and AB subgroups were determined. The titer of anti-A and anti-B were greater than 256 with A or B cells, respectively and were 128 with A₂B cells. The avidities of the positive results were exceed the standard requirement. Most of commercial anti-A antibodies were capable of detecting 78 out of 81 weak-A samples (12 A₂, 17 A₂B, 31 A₃B and 18 A₃). One sample of A₃ can not detected by anti-A from NBC (C9) and 3 A_{Hm} subgroups were not be detected. Of a 23 weak-B subgroup samples, 18 were detected by all commercial anti-B antibodies. One weak B subgroup was identified by 5 commercial reagents (C1, C3, C4, C8, and C9), one sample was detected by only 2 commercial reagents (C4 and C9) and one sample was detected with weakly positive reaction at 4°C after 30 minutes of incubation by commercial C4 only. One A₁B₃ subgroup was detected by all commercial reagents. For the detection of 4 B_{Hm} subgroups, there was one sample identified by all commercial reagents, one sample was detected only by commercial C4, and 2 samples were not be detected. Monoclonal anti-A and anti-B antibodies produced by Thai Red Cross Society also maintained their stable reactions after 24 months of storing at 2-8°C

Key Words : ● Monoclonal anti-A ● Monoclonal anti-B

J Hematol Transfus Med 2010;20:19-25.

