

นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินคุณภาพของสารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง ณ โรงพยาบาลศิริราช สำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี

ยุบลรัตน์ ธนเขตไพศาล สุทธิศักดิ์ แจ่มใส วิจิตชัย บิณฑาประสิทธิ์ กฤษดา โคมตาทอง และ ปาริชาติ เพิ่มพิกุล

ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ การทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะด้วยวิธี flow cytometry crossmatch (FCXM) เป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุด การใช้สารควบคุมผลลบ (negative control serum, NCS) ในการทดสอบจึงมีความสำคัญมากในการช่วยแปลผลความเข้ากันได้ระหว่างผู้ให้และผู้รับอวัยวะอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพสารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเองของห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี Siriraj in-house NCS กับ สารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA® NCS (One Lambda Inc, USA) ในการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM **วัสดุและวิธีการ** เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง การทำ FCXM ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 โดยใช้สารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง Siriraj in-house NCS เปรียบเทียบกับสารควบคุมผลลบ FlowPRA® NCS นำค่า median fluorescence intensity (MFI) ของทั้งสองชนิดมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยใช้ paired t-test และ ทดสอบความสัมพันธ์โดยใช้ Pearson's correlation **ผลการศึกษา** การทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM ในคนปกติที่มีสุขภาพดีจำนวน 20 คน ทั้ง T และ B-FCXM โดยใช้ Siriraj in-house NCS พบว่าให้ค่าเฉลี่ย MFI เท่ากับ 121.20 ± 10.28 และ 247.75 ± 17.45 ตามลำดับ ส่วนการใช้ FlowPRA® NCS ให้ค่าเฉลี่ย MFI เท่ากับ 120.45 ± 11.72 สำหรับ T-FCXM และ 225.80 ± 33.27 สำหรับ B-FCXM เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย MFI พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.5$) โดยมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีมาก ($r = 0.91$) สำหรับ T-FCXM แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับ B-FCXM ($p < 0.0004$) เมื่อทำการประเมินการทดสอบความเข้ากันได้ของผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิตจริงจำนวน 10 คู่ ซึ่งทำเฉพาะ T-FCXM พบว่าค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกันมากคือ 134.50 ± 10.68 และ 134.25 ± 11.04 สำหรับ Siriraj in-house NCS และ FlowPRA® NCS ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสองชนิด ($p = 0.577$) โดยมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีเยี่ยม ($r = 0.98$) **สรุป** สารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง Siriraj in-house NCS เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี สามารถนำมาใช้แทนสารควบคุมผลลบที่ซื้อจากต่างประเทศได้สำหรับการทำ T-FCXM จากการศึกษาี้แสดงถึงการสร้างนวัตกรรมจากการบริหารจัดการทรัพยากรที่สามารถทำได้เองจากงานบริการ มีคุณภาพดี ต้นทุนต่ำลดการจัดซื้อทำให้ประหยัดงบประมาณแผ่นดิน และเป็นแนวทางให้กับห้องปฏิบัติการอื่น สามารถนำไปใช้และพัฒนาให้เหมาะสมกับแต่ละหน่วยงานต่อไปได้

Keywords : ● Flow cytometry crossmatch ● Negative control serum

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2558;25:181-92.

ได้รับต้นฉบับ 13 กรกฎาคม 2558 รับลงตีพิมพ์ 26 สิงหาคม 2558

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ วิจิตชัย บิณฑาประสิทธิ์ ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนวังหลัง แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 E-mail: wibin25@hotmail.com

บทนำ

การรักษาด้วยการปลูกถ่ายไตนั้นเป็นวิธีการรักษาที่ดีที่สุด ในปัจจุบันสำหรับผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ซึ่งหากประสบความสำเร็จจะสามารถทำให้ผู้ป่วยกลับมามีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นสามารถใช้ชีวิตประจำวันได้เหมือนคนปกติ¹ ปัจจัยหนึ่งซึ่งสำคัญมากที่ทำให้การรักษาด้วยการปลูกถ่ายไตไม่ประสบความสำเร็จคือการที่ผู้ป่วยมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของผู้บริจาคไตหรือที่เรียกว่ามี donor specific antibody (DSA) ทำให้เกิด antibody-mediated rejection (AMR) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด acute และ chronic allograft dysfunction และเกิด graft loss ภายหลังการปลูกถ่ายไต² จึงเป็นที่มาของการตรวจความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายไตโดยมีหลักการที่สำคัญคือ การตรวจเลือดผู้ป่วยเพื่อดูว่ามีแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ human lymphocyte antigen (HLA) บนเซลล์ลิมโฟไซต์ของผู้บริจาคไต ซึ่งวิธีการทดสอบที่ใช้และเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันคือ complement-dependent lymphocytotoxicity test (CDC) และ flow cytometric crossmatch test (FCXM) การตรวจด้วยวิธี CDC เป็นวิธีมาตรฐานมีความจำเพาะต่อการเกิด acute rejection จาก DSA ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตจึงต้องได้รับการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธี CDC ทุกราย ถ้าได้ผลเป็น positive ถือเป็นข้อห้ามในการปลูกถ่ายไตโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลบวกต่อ T cell ของผู้ให้อวัยวะ³ ส่วนการทดสอบด้วยวิธี FCXM เป็นการทดสอบที่เป็น cell based assays เช่นเดียวกับ CDC แต่การตรวจหา DSA โดยใช้ fluorochrome-conjugated secondary antibody แล้ววัดผลด้วยเครื่อง flow cytometer มีความไว (sensitivity) มากกว่าวิธี CDC^{4,5} สามารถตรวจหา low titer HLA antibodies และ non-complement binding HLA antibodies ซึ่งอาจทำให้เกิด antibody-mediated rejection (AMR) และ early graft loss ภายหลังการปลูกถ่ายไตได้^{6,7} อย่างไรก็ดีตามอาจมี reaction ที่ไม่ได้เกิดจาก DSA เช่น non-specific binding antibodies หรือ non-HLA antibodies ดังนั้นในการแปลผลการทดสอบ FCXM และการนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจการรักษาโดยการปลูกถ่ายไตอาจจะต้องคำนึงถึง background reaction และ positive reaction ที่ไม่เกี่ยวข้องกับ HLA antibodies ด้วยเหตุนี้ห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบด้วยวิธี FCXM จะต้องทำการประเมินค่าจุดตัดหรือ cut off ในการแปลผลเทียบกับสารควบคุมผลลบมาตรฐานคือ negative control serum (NCS) ตามมาตรฐานของ American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) ด้วยทุกครั้ง⁸

ในประเทศไทย ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้นำ flow cytometry crossmatch test มาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างผู้ป่วยรอรับไตและผู้บริจาคไตที่มีชีวิต เพิ่มเติมจากวิธี CDC ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 โดยศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงทัศนีย์ จันทนียงยังได้มอบให้นักศึกษามหาบัณฑิตสาขาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ทำการศึกษาและพัฒนาจนสามารถนำมาใช้เป็นงานบริการ⁹ โดยเริ่มแรกการทดสอบด้วยวิธี FCXM ได้ใช้ สารควบคุมผลลบมาตรฐานคือ FlowPRA[®] NCS ของบริษัท One Lambda Inc, USA แต่เนื่องจากสารควบคุมผลลบมาตรฐานนี้มีราคาสูง จึงได้มีความคิดพัฒนาและนำเอาสารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเองคือ Siriraj in-house NCS ซึ่งใช้อยู่ในชุดตรวจ DCH HLA-A, B typing tray ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 จนถึงปัจจุบัน สารควบคุมผลลบนี้นี้ได้ผ่านการทดสอบกับเซลล์มาตรฐานโดยการเข้าร่วมประเมินคุณภาพการทดสอบจากองค์กรภายนอก (External Quality Assessment scheme, EQAS) ทั้งในระดับประเทศ คือ ศูนย์รับบริจาคอวัยวะ สภากาชาดไทย และต่างประเทศ คือ Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association (APHIA) และ The University of California at Los Angeles Immunogenetics Center (UCLA) โดยสารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเองนี้ยังคงให้ผลลบจริงชัดเจน 100% จึงทำให้มั่นใจได้ว่า Siriraj in-house NCS ที่เตรียมขึ้นเองนี้มีคุณภาพเหมาะสมสามารถใช้เป็นสารควบคุมผลลบของการทดสอบและเป็นการควบคุมภาพของการทดสอบในการตรวจทางห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารควบคุมผลลบในการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM แทนสารควบคุมผลลบมาตรฐานที่ซื้อจากบริษัท

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพโดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ Siriraj in-house NCS กับ FlowPRA[®] NCS ของบริษัท One Lambda Inc, USA ในการทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการเปลี่ยนอวัยวะด้วยวิธี FCXM โดยดูค่า median fluorescence intensity (MFI) ว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถพัฒนา Siriraj in-house NCS มาใช้ทดแทน FlowPRA[®] NCS ได้จริง เพื่อเป็นการลดต้นทุนของการทดสอบ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจของผู้ป่วยและช่วยประหยัดงบประมาณของประเทศในการจัดซื้อสารควบคุมผลลบ FlowPRA[®] NCS จากต่างประเทศ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง (retrospective study) ในระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 โดยได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

การวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล หมายเลข Si214/2014 ให้ไว้ ณ วันที่ 9 เมษายน พ.ศ. 2557

ความหมายของ Negative Control Serum

Negative Control Serum ได้มาจากซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศชายหมู่ AB ที่มีสุขภาพดี โดยได้รับความยินยอมและผ่านการซักถามประวัติตามเกณฑ์คุณสมบัติของผู้บริจาคเลือด ไม่มีประวัติเคยได้รับเลือดมาก่อน (unsensitized donor)¹⁰ ซีรัมนี้ถูกนำมาตรวจ cytotoxicity เพื่อดูว่าไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HLA แอนติเจนของเซลล์มาตรฐานที่ผ่านการคัดเลือกจากอาสาสมัครที่ไม่มีความสัมพันธ์กันจำนวน 80 รายและมีความหลากหลายของ HLA แอนติเจนครอบคลุม serological HLA specificities ด้วยวิธี CDC และให้ผลลบทั้งหมดจึงนำมาใช้งานได้

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. สารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA[®] NCS ของบริษัท One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA. และ สารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง Siriraj in-house NCS lot DCH 77850
2. Siriraj HLA panel cells จำนวน 80 รายซึ่งมี HLA antigens ครอบคลุม serological HLA specificities and CREGs groups ในเชื้อชาติคนไทยทั้ง HLA class I และ HLA class II
3. Lab Screen Mixed HLA Class I and Class II (LSM12) ของบริษัท One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA. ใช้เป็น panel screen cells เพิ่มเติมเพื่อตรวจดู low titer antibody ด้วยเทคนิค solid-phase immunoassays
4. Whole และ T lymphocytes จำนวน $0.5 - 1 \times 10^6$ cells ของคนปกติที่เลือกจากเซลล์ที่ใช้ในการตรวจหาเนื้อเยื่อ จำนวน 20 ราย โดยใช้ทดสอบกับ FlowPRA[®] NCS และ Siriraj in-house NCS ด้วยวิธี FCXM สำหรับ B และ T lymphocytes ตามลำดับเพื่อดูความแตกต่างของค่า median fluorescence intensity (MFI) ที่วัดได้และใช้หาค่าเฉลี่ย ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารควบคุมผลลบทั้งสองชนิด
5. T lymphocytes จำนวน $0.5 - 1 \times 10^6$ cells ของผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิต ที่มาทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการเปลี่ยนไตจริงจำนวน 10 คู่ เพื่อดูค่า MFI FlowPRA[®] NCS และ Siriraj in-house NCS

วิธีการ

1. นำซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศชายหมู่เลือด AB ซึ่งมีคุณสมบัติตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตเพียงรายเดียวที่

จะนำมาทำเป็นสารควบคุมผลลบ Siriraj in-house NCS นำมาทดสอบกับ Siriraj HLA panel cells จำนวน 80 ราย เพื่อตรวจหา panel reactive antibodies (PRA) และ HLA specificities ด้วยวิธี CDC โดยใช้ T และ B lymphocytes ทดสอบกับ human AB serum lot DCH 77850 ที่ coat อยู่ใน Terasaki plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที และที่ 37 °C นาน 60 นาที สำหรับ T และ B lymphocyte ตามลำดับ ครบเวลาใส่ rabbit complement ที่จำเพาะต่อทั้ง T หรือ B lymphocytes แล้วนำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 และ 120 นาที สำหรับ T และ B lymphocytes ตามลำดับ ครบเวลาย้อมด้วย Eosin Y และหยุดปฏิกิริยาด้วย formaldehyde เก็บชุดทดสอบไว้ที่อุณหภูมิ 2-6 °C หนึ่งคืนแล้วนำมาอ่านผลด้วย inverted phase microscope

2. นำสารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง Siriraj in-house NCS ที่ผ่านการตรวจด้วยวิธี CDC และให้ผลเป็นลบ มาทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยชุดตรวจ Lab Screen Mixed HLA Class I and Class II (LSM12) ด้วยวิธี Luminex[™] fluoroanalyzer¹¹ โดยใช้เครื่อง Luminex One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA. อ่านผลการแปลแสงของสาร fluorescence ได้เป็นค่า mean fluorescence intensity (MFI) เทียบกับ negative control และค่า background ของแต่ละ bead ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมของเครื่อง ตรวจสอบและแปลผลซ้ำโดยอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญและมีประสบการณ์สูง

3. นำสารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA[®] NCS และ สารควบคุมผลลบที่เตรียมขึ้นเอง Siriraj in-house NCS มาทดสอบกับ lymphocytes ของคนปกติจำนวน 20 ราย ด้วยวิธี FCXM ปรับเปลี่ยนจากวิธีการของ กฤษดา โภคตาทองและคณะ ได้รายงานไว้^๑ โดยใช้ T และ whole lymphocytes ทดสอบกับ สารควบคุมผลลบทั้งสองชนิดโดย incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และที่ 37 °C นาน 30 นาที บั่นล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นเติม Phycoerythrin labeled anti-CD3 หรือ Phycoerythrin labeled anti-CD19 และ goat F(ab')₂ anti-human IgG-FITC สำหรับ T และ B lymphocyte FCXM ตามลำดับ นำไป incubate ต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้วบั่นล้างด้วย PBS และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 1% paraformaldehyde นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

4. ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิตจริงจำนวน 10 คู่ ด้วยวิธี FCXM โดยใช้ T lymphocytes ของผู้บริจาคไตทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยและทดสอบกับ

FlowPRA[®] NCS และ Siriraj in-house NCS เป็นตัวควบคุมผลลบโดยดูค่า MFI ที่ได้ แล้วนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์และแปลผลโดยดูค่า MFI และค่า cut off เทียบกับ positive control serum

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้สถิติเชิงพรรณนาในการวิเคราะห์ข้อมูลซึ่งได้ทำการทดสอบความเป็น normal distribution แล้ว โดยดูค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า MFI ที่วัดได้ เปรียบเทียบความแตกต่างหาค่า *p*-values ของค่าเฉลี่ยของ MFI โดยวิธี paired t-test และทดสอบความสัมพันธ์ของสารควบคุมผลลบทั้งสองโดยวิธี Pearson's correlation โดยใช้ซอฟต์แวร์คำนวณค่า *p*-values และค่า *r* จาก โปรแกรม PASW statistics ver.18.0, SPSS (Hong Kong) Ltd., Westlands enter, Quarry Bay, Hong Kong.

ผลการศึกษา

จากการศึกษาโดยนำ human AB serum lot DCH 77850 มาทดสอบกับ Siriraj HLA panel cells จำนวน 80 ราย ดังแสดงใน Table 1 ด้วยวิธี microlymphocytotoxicity และนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกมาคำนวณหาค่า PRA พบว่า human AB serum นี้ให้ผลลบกับ 80 HLA panel cells ทั้งหมด แสดงว่าใน human AB serum นี้ไม่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HLA แอนติเจนทั้ง class I และ class II ในระดับซีโรโลยี และมีค่า PRA เป็นศูนย์ จึงนำมาทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อตรวจดู low titer antibody ด้วยชุดตรวจ Lab Screen Mixed ด้วยวิธี Luminex ปรากฏว่าให้ผลเป็นลบต่อ bead จึงยืนยันได้ว่า Siriraj in-house NCS นี้ไม่มีแอนติบอดีหรือ PRA ที่จำเพาะกับแอนติเจนในระบบ HLA ทั้ง class I และ class II จึงนำ

มาใช้เป็นสารควบคุมผลลบสำหรับใช้ในการงานตรวจทางห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยีได้ เมื่อนำสารควบคุมผลลบ Siriraj in-house NCS ที่เตรียมได้และใช้ในการบริการทางซีโรโลยีมาทำการทดสอบต่อโดยใช้เซลล์ whole และ T lymphocyte ของคนปกติจำนวน 20 ราย ด้วยวิธี FCXM (two-color technique) ดัง Figure 1 เพื่อประเมินคุณภาพสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้โดยเปรียบเทียบค่า MFI ที่วัดได้กับค่า MFI ของสารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA[®] NCS พบว่าค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบ Siriraj in-house NCS เท่ากับ 121.20 ± 10.28 และ 247.75 ± 17.45 สำหรับ T และ B-FCXM ตามลำดับ ส่วนสารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA[®] NCS ได้ค่า MFI เฉลี่ยของ T-FCXM เท่ากับ 120.45 ± 11.72 และค่า MCS เฉลี่ยของ B-FCXM เท่ากับ 225.80 ± 33.27 ดังแสดงใน Table 2 และ Table 3

เมื่อประเมินคุณภาพโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ T-FCXM พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.504$ และมีค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $r = 0.91$ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับ B-FCXM คือ $p < 0.0004$ ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง $r = 0.76$ ดังแสดงใน Table 4, Figure 2 และ Figure 3

ผลที่ได้จากการประเมินคุณภาพสารควบคุมผลลบทั้งสองจะเห็นว่าค่า MFI เฉลี่ยของ T-FCXM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีเยี่ยม แสดงว่าสารควบคุมผลลบทั้งสองน่าจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันสามารถที่จะนำมาใช้ทดแทนกันได้ในการทดสอบความเข้ากันได้ จึงนำมาทำการประเมินในการทดสอบความเข้ากันได้ด้วย

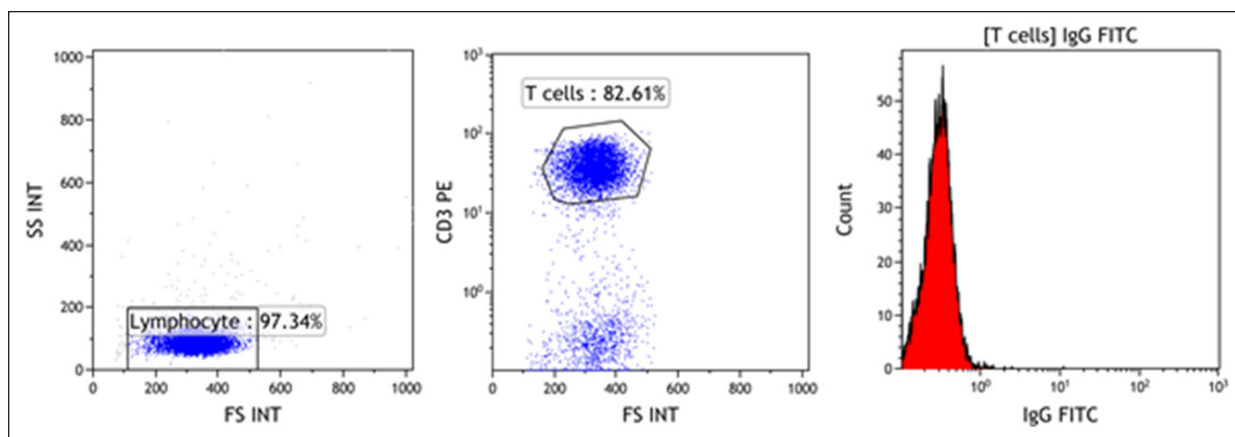


Figure 1 Left dot plot displays Forward scatter (FS) Versus Side scatter (SS) of mononuclear cell.

Center dot plot displays FS versus FL-2 (CD3 PE) of gate T cells

Right histogram displays FL-1 (anti-human IgG FITC) fluorescence of T cells

Table 1 List of HLA panel cell for HLA cytotoxicity test

Panel cell ID	HLA antigen								Panel cell ID	HLA antigen							
	A	A	B	B	DR	DR	DQ	DQ		A	A	B	B	DR	DR	DQ	DQ
P087000539	1	24	*37:01	*44:03	*07:01	*10:01	*02:01	*05:01	D000009198	*02:07	24	46	54	*04	*12	*04	*05
P158000925	*1102	*24:02	27	56	*04:05	*14:01	*01:01	*05:02	D000012773	203	11.1	18	27	*12:02	*14:04	*05:03	*03:01
P000001140	*1101	*11:01	*07:02	*40:02	*04:03	*12:02	*05:02	*03:02	D000012778	203	24	13	38	*11:01	*15:02	*05:01	*03:01
P000002660	31	33	*40:01	*15:02	*07:01	*12:02	*02:01	*03:01	D000012780	2	11.1	13	60	*04:06	*15:02	*05:01	*03:02
P000003005	*0101	*11:01	*37:01	75	*11:06	*15:01	*06:01	*03:01	D000012785	2	28	46	60	*04:05	*03:01	*04:01	*03:03
P000003321	*0207	*31:01	39	48	*11:01	*11:01	*03:01	*03:01	D000012793	1	24	13	57	*07:01	*10:01	*05:01	*03:03
0000000811	*0203	*02:03	*04:01	*15:02	*04:06	*08:03	*06:01	*03:02	D000012794	2	11.1	46	61	*12:02	*15:01	*06:01	*03:01
0000001118	*0207	11.1	46	57	*14:04	*15:01	*05:03	*06:01	D000012802	11.1	24	35	51	*09:01	*11:06	*03:01	*03:03
0000001968	*3303	*74:01	*48:01	*58:01	*04	*03	*02	*02	D000012805	30	33	13	58	*07:01	*16:02	*02:02	*05:02
0000003258	*1101	*33:03	*58:01	*15:25	*03:01	*15:02	*02:01	*05:02	D000012806	11.1	34	46	62	*04:06	*09:01	*03:02	*03:03
0000003977	*1101	*33	*46:01	*58:01	*11:01	*12:02	*03:01	*03:01	D000012807	2	11.1	18	46	*04:01	*14:01	*05:03	*03:02
0000004605	*0206	*30:01	*13:02	*15:12	*07:01	*15:02	*02:01	*05:02	D000012810	203	11.1	39	60	*0405	*0901	*0401	*0303
0000005342	*2407	*33:03	*35:01	*15:25	*04:05	*16:02	*04:01	*05:02	D000012811	11.1	24	61	75	*11:01	*12:02	*03:01	*03:01
0000005375	*0207	*2407	*1801	*3505	*11	*16	*05	*0301	D000012818	11.1	28	55	62	*09:01	*15:02	*06:01	*03:03
0000005451	*0206	*11:01	*40:01	*40:06	*09:01	*16:02	*05:02	*03:03	D000012819	11.2	33	27	44	*07:01	*13:12	*02:02	*03:01
0000006504	*0203	*02:03	13	39	*04:05	*04:05	*04:01	*04:01	D000012847	11.1	24	51	61	*04:03	*15:02	*05:01	*03:02
000007637	*1101	*26:01	*51:01	*15:25	*04:05	*11:01	*03:01	*03:02	D000012848	3	11.1	18	27	*01:01	*02	*05:01	*05:02
0000007644	*0301	*33:03	*55:01	*58:01	*07:01	*13:01	*03:03	*06:05	D000012850	2	24	46	55	*03:01	*15:01	*02:01	*06:02
0000007650	*2402	*26:01	18	27	*12:02	*12:02	*03:01	*03:01	D000012851	11.1	33	38	44	*07:01	*15:02	*02:02	*05:02
0000007971	11.1	11.2	*52:01	*40:01	*04	*09:01	*03:01	*03:03	D000012869	11.1	24	62	75	*15:02	*15:02	*05:01	*06:01
0000008198	*1101	*24:02	*39:01	*56:01	*11:01	*15:01	1	7	D000012878	*33	*33	*27:02	*15:17	*07:01	*03:01	*02:01	*03:03
0000009623	203	11.2	13	60	*04	*16	-	-	D000012903	203	32	38	75	*08:03	*12:02	*03:01	*06:01
0000010239	2	11.1	13	60	*04:06	*11:01	*03:01	*03:02	D000012912	11.1	24	7	46	*09:01	*10:01	*05:01	*03:01
0000010246	*0207	*11:01	*51:01	*15:02	*12:02	*14:02	*03:01	*03:01	D000012951	2403	33	18	35	*11:01	*12:02	*03:01	*03:01
0000010256	*1102	*24:07	*27:04	*15:13	*03:01	*14:01	*02:01	*05:02	D000012961	11.1	26	27	75	*07:01	*15:01	*03:03	*06:01
0000010257	*1101	*11:01	*18:01	*51:01	*12:02	*14:01	*03:01	*05:02	D000012973	24	31	35	75	*04:05	*10:01	*04:01	*05:01
0000010273	*2407	*32:01	*27:13	*15:13	*01:01	*12:02	*05:01	*03:01	D000012974	11.1	24	18	35	*12:02	*12:02	*03:01	*03:01
0000010356	2	11.1	35	54	*15:01	*15:02	*05:01	*06:01	D000013018	11.1	2403	18	38	*1202	*1202	*0301	*0301
0000010358	24	33	13	58	*03:01	*15:02	*02:01	*05:02	D000013074	203	34	13	60	*12:02	*14:05	*03:01	*05:03
D000007421	11.1	-	*13:01	*15:02	*12	*15	*05	*05	D000013098	2403	30	13	18	*07:01	*12:02	*02:02	*03:01
D000007467	3	11.1	*07:02	*35:05	*12	*15	*06	*03:01	D000013103	11.1	33	44	52	*07:01	*12:02	*02:02	*05:02
D000007534	11.1	30	*13:02	*15:25	*07:01	*15	*02	*05	D000013280	203	24	13	39	*13:01	*15:02	*05:01	*06:05
D000008681	2	11.1	18	46	*09	*12	-	-	D000013366	2	23	39	58	*04	*07	*02	*04
D000008699	11.1	-	7	13	*15	*15	*05	*06	D000013387	3	11.1	35	46	*09:01	*14:04	*05:03	*03:03
D000008733	203	33	39	58	*04	*15	*04	*06	D000013432	2	11.1	51	75	*04:03	*12:02	*03:01	*03:02
D000008740	*0207	33	56	60	*11	*14	-	-	D000013498	2	-	46	-	*04:01	*14:01	*05:02	*03:02
D000008752	*0207	24	*13:01	*15:02	*15	*16	-	-	D000013499	1	2	52	57	*04:07	*14:10	*05:03	*03:02
D000009108	1	2	38	46	*08	*09	-	-	D000013603	11.1	-	38	62	*08:03	*14:01	*05:03	*06:01
D000009136	*0203	24	*13:01	*15:12	*15	*16	*05	*05	D000014052	2	203	38	46	*09	*15	*03	*05
D000009172	11.1	24	27	44	*07	*11	*02	*03:01	D000014171	2	11.1	60	-	*08:03	*09:01	*06:01	*03:03

Table 2 Median Fluorescence Intensity (MFI) of FCXM for T cells between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS

Cell No.	Median Fluorescence Intensity (MFI)		Δ
	FlowPRA [®] NCS	Siriraj in-house NCS	
1	121.00	117.00	4.00
2	115.00	121.00	-6.00
3	123.00	125.00	-2.00
4	127.00	130.00	-3.00
5	128.00	128.00	0.00
6	121.00	124.00	-3.00
7	113.00	113.00	0.00
8	117.00	119.00	-2.00
9	141.00	130.00	11.00
10	117.00	123.00	-6.00
11	121.00	125.00	-4.00
12	135.00	129.00	6.00
13	130.00	133.00	-3.00
14	96.00	100.00	-4.00
15	120.00	129.00	-9.00
16	139.00	131.00	8.00
17	119.00	122.00	-3.00
18	123.00	124.00	-1.00
19	101.00	99.00	2.00
20	102.00	102.00	0.00
Average	120.45	121.20	-0.75
SD	11.72	10.28	

Δ = difference between FlowPRA[®] NCS and Siriraj in-house NCS; SD = Standard deviation

Table 3 Median fluorescence intensity (MFI) of FCXM for B cells between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS

Cell No.	Median Fluorescence Intensity (MFI)		Δ
	FlowPRA [®] NCS	Siriraj in-house NCS	
1	221.00	249.00	-28.00
2	249.00	266.00	-17.00
3	250.00	259.00	-9.00
4	223.00	248.00	-25.00
5	254.00	266.00	-12.00
6	230.00	249.00	-19.00
7	233.00	258.00	-25.00
8	226.00	265.00	-39.00
9	304.00	265.00	39.00
10	207.00	238.00	-31.00
11	210.00	254.00	-44.00
12	199.00	246.00	-47.00
13	206.00	237.00	-31.00
14	161.00	192.00	-31.00
15	227.00	245.00	-18.00
16	296.00	260.00	36.00
17	203.00	223.00	-20.00
18	208.00	247.00	-39.00
19	217.00	252.00	-35.00
20	192.00	236.00	-44.00
Average	225.80	247.75	-21.95
SD	33.27	17.45	

Δ = difference between FlowPRA[®] NCS and Siriraj in-house NCS; SD = Standard deviation

Table 4 The comparison of average median fluorescence intensity (MFI) of FCXM for T and B cells between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS

Type	FlowPRA [®] NCS		Siriraj in-house NCS		df	t	p-value
	Average MFI	SD	Average MFI	SD			
T- cells	120.45	11.72	121.20	10.28	19	-0.68	0.504
B- cells	225.80	33.27	247.75	17.45	19	-4.27	0.0004*

* Significant at 0.05 level

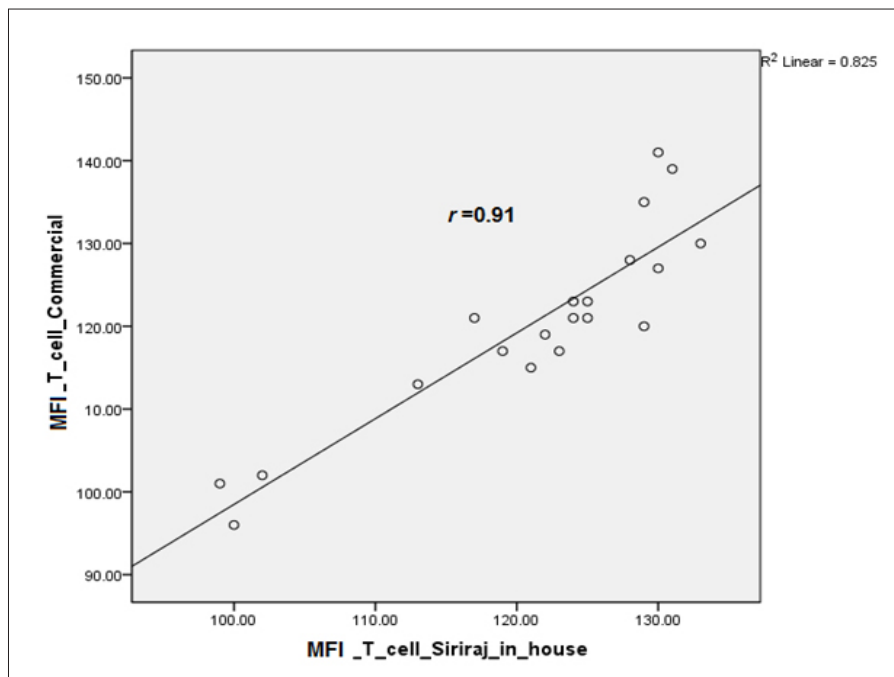


Figure 2 Correlation of MFI between

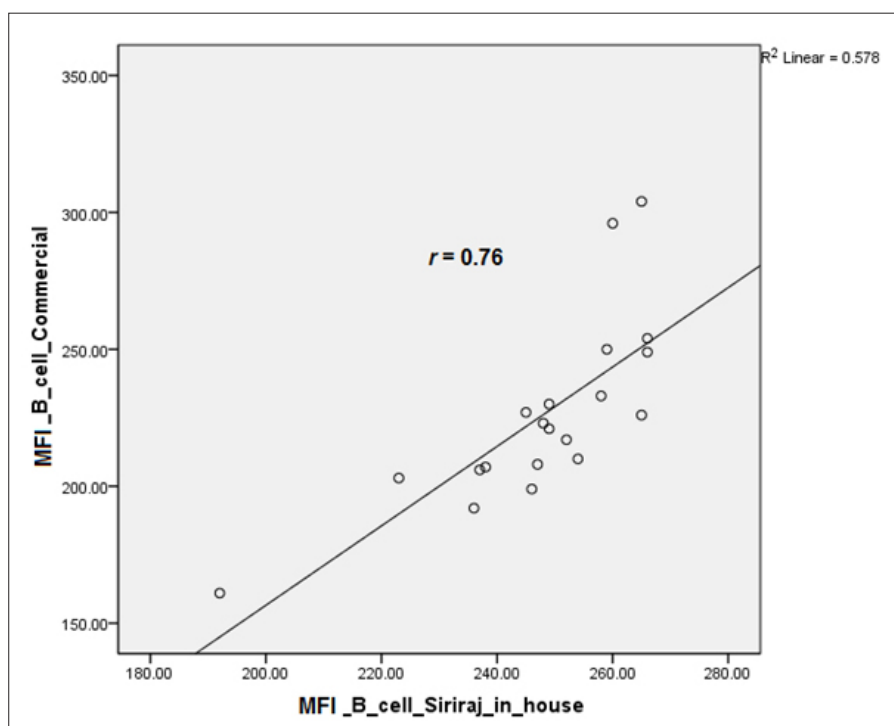


Figure 3 Correlation of MFI between Siriraj in-house and FlowPRA[®] NCS for T-FCXM Siriraj in-house and FlowPRA[®] NCS for B-FCXM

วิธี FCXM ของคู่ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิตจริงจำนวน 10 คู่ โดยทำเฉพาะ T-FCXM ได้ผลดังแสดงใน Table 5, Table 6 และ Figure 4

เมื่อประเมินผลการทดสอบความเข้ากันได้เฉพาะ T-FCXM ของคู่ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิตจริงจำนวน 10 คู่ พบว่าค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันมาก คือ 134.50 ± 10.68 และ 134.25 ± 11.04 สำหรับ Siriraj in-house NCS และ FlowPRA[®] NCS ตามลำดับ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสอง ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความ

เชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ($p = 0.577$) และสารควบคุมผลลบทั้งสอง มีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีเยี่ยม ($r = 0.98$)

ในจำนวนคู่ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิตจริงจำนวน 10 คู่ พบว่ามี 1 คู่ คือคู่ที่ 6 ที่ให้ผลการทดสอบ สำหรับ T-FCXM เป็นบวกเหมือนกัน คือ ค่า MFI ของคู่ตัวอย่างให้ผลเท่ากับ 381 ส่วนค่า MFI ของ FlowPRA[®] NCS และ Siriraj in-house NCS ให้ค่าเท่ากับ 128 และค่า cut off เท่ากับ 168 เหมือนกัน ส่วนที่เหลือ 9 คู่ เมื่อเทียบค่า MFI ของตัวอย่างทดสอบกับสารควบคุมผลลบทั้งสองชนิดให้ผลการทดสอบเป็นลบเหมือนกันหมด

Table 5 Median Fluorescence Intensity (MFI) of T- FCXM between FlowPRA[®] NCS and Siriraj in-house NCS and the MCS of test results

Pair		MFI of test	Median Fluorescence Intensity (MFI)					Result
			FlowPRA [®]	Cut off	Result	Siriraj in-	Cut off	
			NCS			house NCS		
1	Auto-XM	159	136	176	Negative	136	176	Negative
	Allo-XM	151	160	200	Negative	158	198	Negative
2	Auto-XM	150	158	198	Negative	159	199	Negative
	Allo-XM	140	146	186	Negative	149	189	Negative
3	Auto-XM	136	129	169	Negative	132	172	Negative
	Allo-XM	144	144	184	Negative	140	180	Negative
4	Auto-XM	141	135	175	Negative	137	177	Negative
	Allo-XM	144	130	170	Negative	130	170	Negative
5	Auto-XM	136	117	157	Negative	120	160	Negative
	Allo-XM	135	127	167	Negative	127	167	Negative
6	Auto-XM	119	118	158	Negative	121	161	Negative
	Allo-XM	381	128	168	Positive	128	168	Positive
7	Auto-XM	120	122	162	Negative	121	161	Negative
	Allo-XM	136	128	168	Negative	128	168	Negative
8	Auto-XM	130	131	171	Negative	129	169	Negative
	Allo-XM	139	134	174	Negative	133	173	Negative
9	Auto-XM	146	131	171	Negative	131	171	Negative
	Allo-XM	142	132	172	Negative	130	170	Negative
10	Auto-XM	144	141	181	Negative	141	181	Negative
	Allo-XM	156	138	178	Negative	140	180	Negative
Average			134.25		134.50			
SD			11.04		10.68			

cut off = MFI of NCS + 40 median channel shift (MCS)*; SD = Standard deviation

* 40 is calculated from 2SD MFI of 30 healthy normal control test for T-FCXM at Siriraj Hospital

Table 6 The comparison of average median fluorescence intensity (MFI) of FCXM for T cells between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS in patient kidney transplant with living related donor

Type	FlowPRA [®] NCS		Siriraj in-house NCS		df	t	p-value
	Average MFI	SD	Average MFI	SD			
T- cells	134.25	11.33	134.50	10.96	19	-0.567	0.577

* Significant at 0.05 level

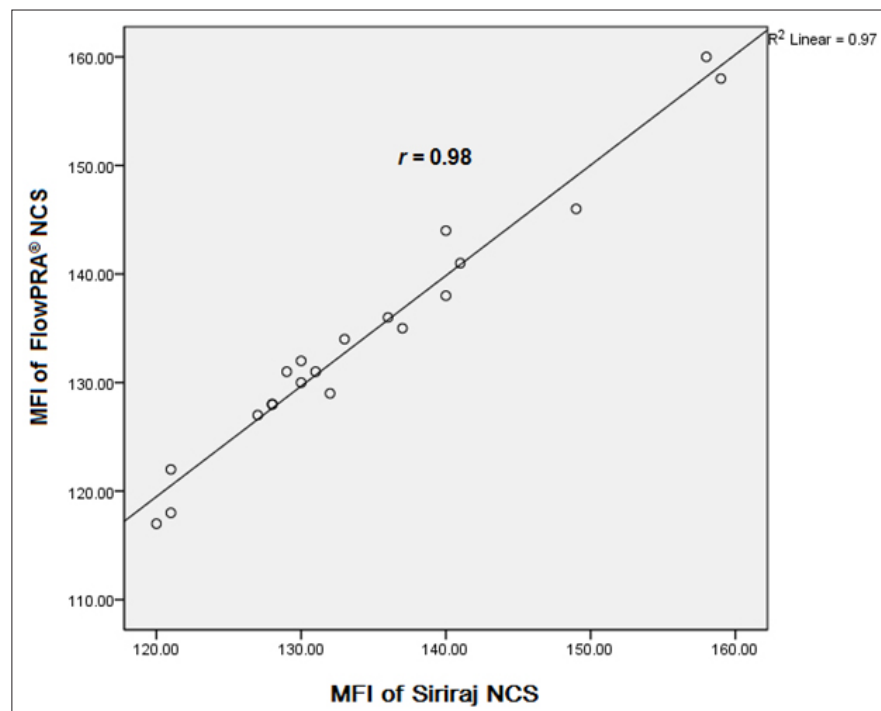


Figure 4 Correlation of MFI between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS in patient kidney transplant with living related donor

วิจารณ์

การตรวจความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายไตมีหลักการที่สำคัญ คือการตรวจเลือดผู้ป่วยเพื่อดูว่ามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้บริจาคไต (donor specific antibody, DSA) หรือไม่ เพื่อป้องกัน antibody-mediated rejection (AMR) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด acute และ chronic allograft dysfunction และเกิด graft loss ภายหลังการปลูกถ่ายไต วิธีการทดสอบที่ใช้และเป็นที่ยอมรับในปัจจุบันคือ CDC และ FCXM การทดสอบด้วยวิธี FCXM เป็น cell-based assays มีความไวมากกว่าวิธี CDC สามารถตรวจหา low titer HLA antibodies และ non-complement binding HLA antibodies วิธี FCXM นี้มีข้อที่ต้องพึงระวัง คืออาจมี reaction ที่ไม่ได้เกิดจาก DSA เช่น non-specific binding antibodies หรือ non-HLA antibodies ดังนั้นในการแปลผลเพื่อนำไปใช้ประกอบการตัดสินใจการรักษาร่วมกับการปลูกถ่ายไตจึงต้องให้ความสำคัญกับ background reaction

และ positive reaction ที่ไม่เกี่ยวข้องกับ HLA antibodies ด้วยเหตุนี้ห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบด้วยวิธี FCXM จึงต้องทำการประเมินค่าจุดตัดหรือ cut off ซึ่งห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อคณะแพทยศาสตร์ศิริราชใช้ค่า MFI ของ NCS+2SD โดยค่า 2SD ซึ่งผ่านการคำนวณและหาค่าไว้แล้วเท่ากับ 40 และ 100 สำหรับ T-FCXM และ B-FCXM ตามลำดับ แปลผลเทียบกับค่า MFI ของสารควบคุมผลลบ ตามมาตรฐานของ American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI)

การศึกษานี้ได้ทำการประเมินคุณภาพของสารควบคุมผลลบสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธี FCXM โดยเปรียบเทียบระหว่าง FlowPRA[®] NCS ซึ่งสั่งซื้อจากต่างประเทศ กับ Siriraj in-house NCS ที่เตรียมขึ้นเองจากซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศชายที่มีสุขภาพดีหมู่ AB และผ่านการทดสอบเซลล์มาตรฐานซึ่งมี HLA แอนติเจนหลากหลายชนิดแตกต่างกันจำนวน 80 ราย ด้วยวิธี CDC ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เพียง 40-60 รายเท่านั้น¹² เพื่อเพิ่มความ

มั่นใจในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HLA ได้มากขึ้น อีกทั้งตรวจยืนยันด้วยน้ำยาชุดตรวจ solid-phase immunoassays และทั้งสองวิธีนี้ให้ผลเป็นลบเหมือนกันจึงนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี FCXM (two-color technique) เพื่อประเมินคุณภาพว่าเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้โดยเปรียบเทียบค่า MFI ที่วัดได้ของสารควบคุมผลลบมาตรฐาน FlowPRA[®] NCS กับ Siriraj in-house NCS ในคนปกติจำนวน 20 ราย พบว่าค่า MFI เฉลี่ยของการใช้สารควบคุมผลลบทั้งสองชนิดให้ผลดีเหมือนกันในการตรวจ T-FCXM แต่ B-FCXM ยังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงนำสารควบคุมผลลบทั้งสองชนิดมาทดสอบเพิ่มเพื่อให้เกิดความมั่นใจโดยทำการทดสอบความเข้ากันได้ของคู่ผู้ป่วยและผู้บริจาคไตที่มีชีวิต ณ โรงพยาบาลศิริราชจริง โดยทำเฉพาะ T-FCXM จำนวน 10 คู่ พบว่าค่า MFI เฉลี่ยของสารควบคุมผลลบทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันมากคือ 134.50 ± 10.68 และ 134.25 ± 11.04 สำหรับ Siriraj in-house NCS กับ FlowPRA[®] NCS ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.577$ รวมทั้งมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีเยี่ยม ($r = 0.98$) แสดงว่าสารควบคุมผลลบทั้งสองนี้มีความคล้ายคลึงกันมากสามารถนำมาใช้ในการทดสอบ T-FCXM สำหรับงานบริการได้จริง จึงได้นำมาใช้ในงานประจำจนถึงปัจจุบันรวมถึงการเข้าร่วมทดสอบความสามารถทางห้องปฏิบัติการสำหรับการทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะกับสถาบันชั้นนำซึ่งเป็นที่ยอมรับกันในระดับสากลคือ The University of California at Los Angeles Immunogenetics Center (UCLA) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 โดยได้ผลการทดสอบเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ในระดับประเทศทั้งหมดจำนวน 17 สถาบัน แต่สำหรับ B-FCXM ถึงแม้สารควบคุมผลลบทั้งสองจะมีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรงทางบวกในระดับดีแต่ก็มีความแตกต่างกันของค่า MFI เฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ Siriraj in-house ให้ค่า MFI เฉลี่ยสูงกว่าทั้งนี้เนื่องมาจากบนผิวของ B lymphocyte มี receptor ที่สามารถจับเกาะกับแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะได้ทำให้ค่า MFI ของสารควบคุมผลลบทั้งสองมีค่าแตกต่างกัน จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมหรือควร treat NCS ด้วย Dithiotereitol (DTT) ก่อนทำการทดสอบเพื่อลดการรบกวนจากแอนติบอดีชนิด IgM ในซีรัมนั้นโดย DTT จะไปทำลาย disulfide bonds ของแอนติบอดีชนิด IgM¹³ ปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการจึงยังคงใช้สารควบคุมผลลบที่ซื้อมาสำหรับใช้ในการทดสอบ B-FCXM เท่านั้น

จากผลการประเมินเปรียบเทียบคุณภาพของสารควบคุมผลลบในการทดสอบความเข้ากันได้ด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรีของ

Siriraj in-house NCS ซึ่งนำมาทดแทน FlowPRA[®] NCS ในการทดสอบ T-FCXM พบว่ามีคุณภาพดีทัดเทียมกับสารควบคุมผลลบจากต่างประเทศ ช่วยทำให้แพทย์มีความมั่นใจสามารถเลือกปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีความเหมาะสมและช่วยระบุผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงได้ล่วงหน้า เป็นการหลีกเลี่ยงการเกิด graft rejection ในอนาคต เพราะผลบวกของ T-FCXM มีความสัมพันธ์กับการลดลงของ graft survival¹⁴ นอกจากนี้การใช้สารควบคุมผลลบที่เตรียมเองยังช่วยลดการจัดซื้อสารควบคุมผลลบมาตรฐานจากต่างประเทศซึ่งมีความแตกต่างของต้นทุนสูงกว่าถึง 200 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาตรที่เท่ากัน การศึกษานี้แสดงถึงการสร้างนวัตกรรมจากการบริหารจัดการทรัพยากรที่สามารถหาได้เองจากงานบริการประจำ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่หน่วยงาน อีกทั้งยังเป็นแนวทางให้กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ สามารถนำไปใช้และพัฒนาให้เหมาะสมกับงานแต่ละหน่วยงานได้ต่อไป

สรุป

การเตรียมสารควบคุมผลลบขึ้นใช้เองของห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยี ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้ก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะด้วยวิธี โฟลไซโตเมทรี นั้นมีคุณภาพดี เชื่อถือได้และมีต้นทุนต่ำสามารถนำมาใช้แทนสารควบคุมผลลบที่ซื้อจากต่างประเทศได้เฉพาะการทำ T-FCXM เท่านั้น ส่วน B-FCXM นั้นพบว่ายังไม่เหมาะสมควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงทัศนัยณี จันทนียังยง ผู้ริเริ่มงาน Flow Cytometry lymphocyte crossmatch เป็นแห่งแรกของประเทศไทย นางกุสุมา อภัยเสวตร์ นางสาวสมพร งามถาวรวงศ์ นางดรุณี ไชยสงคราม นางพรณพิมล หลวงตระกูล เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อระดับซีโรโลยีและระดับยีน ดร.โกมล หลวงตระกูล แพทย์หญิงกุลวรา กิตติสารศ ให้คำปรึกษาด้านสถิติ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ให้คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Pempikul P, Koktathong K, Thanaketspaisan Y, Bintaprasit W, Chamsai S, Luangtrakul K, et al. Significance of flow cytometry re-crossmatch in living related kidney transplantation at Siriraj Hospital. *J Hematol Transfus Med* 2014;24:111-8.
2. Puttarajappa C, Shapiro R and Tan HP. Antibody mediated rejection in kidney transplantation: A review. *Transplantation* 2012;19372:1-9.

3. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issue associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95:19-47.
4. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch. dual-color analysis of T and B cells reactivities. *Transplantation* 1989;48:834-40.
5. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2807-14.
6. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, et al. The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1993;56:294-8.
7. Kurihara K, Kitada H, Miura Y, Teresaki S, Kuku K, Miyamoto K, et al. Impact of flow cytometry crossmatch B-cell positive on living renal transplantation. *Transplant Proc* 2013;45:2903-6.
8. Holcomb JE, Lebeck LK. Flow Cytometry. In: *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, Hahn AB, Land GA, Strothman RM, editors. *ASHI Laboratory Manual*. 4th eds. Mount Laurel, NJ: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2000.
9. Koktathong K, Vejbaesya S, Bejrachandra S, Pattanapanyasat K. Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation. *J Med Assoc Thai* 2005;88:769-74.
10. Hamrick CW, Lebeck LK. Flow Cytometric T and B cell Cross-matching. In: *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. Hahn AB, Land GA, Strothman RM, editors. *ASHI Laboratory Manual*. 4th eds. Mount Laurel, NJ: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2000.
11. Pretl K, Chesterton KA, Scholander JT, et al. Accurate rapid characterization of HLA specific antibodies using Lminex technology. *Hum Immunol* 2003;64(Suppl 1):S108.
12. Zmijewski CM. Overview of detection and identification of HLA antibodies (I.D.1.9). In: *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. Nikaein A, editor. *ASHI Laboratory Manual*. 3rd ed.
13. Cirocco R, Mendiolina J, Biondi L, Moritz M. Selection of appropriate human sera for negative controls in flow crossmatching to determine renal transplantation compatibility. (Abstract) *Human Immunol* 2013;74:58.
14. Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, Schnitzler MA, Tuttle-Newhall J, Xiao H, et al. The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplant Proc* 2010;42:3471-4.

Evaluation of Siriraj In-house Negative Control Serum for Flow Cytometry Crossmatch

Yubolrat Thanaketpaisarn, Sutthisak Chamsai, Wichitchai Bintaprasit, Krisada Koktathong
and Parichart Permpikul

Department of Transfusion Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Abstract:

Background: Flow cytometry crossmatch (FCXM) is one of the most sensitive methods to detect donor specific antibody in recipient undergoing kidney transplantation. The negative control serum (NCS) in FCXM is important to establish the baseline value for analysis the results to determine histocompatibility of the donor's organ transplanted to recipient. **Objective:** The purpose of this study is to evaluate the quality of Siriraj in-house NCS compared with the commercial NCS. **Materials and Methods:** Retrospective data review of FCXM using Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS during January, 2013 to June, 2013 were analyzed. We observed the correlation and compared median fluorescence intensity (MFI) of both NCS. **Results:** For T and B-FCXM in 20 normal healthy donors using Siriraj in-house NCS, the average MFI were 121.20 ± 10.28 and 247.75 ± 17.45 , respectively. For FlowPRA[®] NCS, the average MFI were 120.45 ± 11.72 for T-FCXM and 225.80 ± 33.27 for B- FCXM. When compare the difference of average MFI between Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS, we found that they had high correlation ($r = 0.91$) without significant difference ($p = 0.5$) but had significant difference for B- FCXM ($p < 0.0004$). When performing only T-FCXM in 10 pairs of living related donor kidney transplant, LRD KT, we found average MFI of Siriraj in-house NCS and FlowPRA[®] NCS were 134.50 ± 10.68 and 134.25 ± 11.04 , respectively, without significant difference ($p = 0.577$) and high correlation ($r = 0.98$). **Conclusion:** Siriraj in-house negative control serum for FCXM can be used for T-FCXM. This innovation is practical and can be used economically without compromising quality of the results. Based on this study other applications can be done to minimize expenses that needed for establish reliable assay.

Keywords : ● Flow cytometry crossmatch ● Negative control serum

J Hematol Transfus Med 2015;25:181-92.