

การผลิตน้ำยาแอนติฮิวแมนโกลบูลิน (โพลีस्पไซฟิก) สำหรับใช้ในงานธนาคารเลือด

ยิ่งตะวัน ตันวิสุทธิ* จตุรพร พรศิลป์** ปริยานาถ วงศ์จันทร์*

บทคัดย่อ

น้ำยา Anti-human globulin (polyspecifics) ถูกใช้ในทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก โดยเฉพาะงานธนาคารเลือด เทคนิค Direct anti globulin test ถูกนำมาตรวจเพื่อหาแอนติบอดีที่จับกับเม็ดเลือดแดงในร่างกาย ได้แก่ Hemolytic disease of the newborn (HDN), Autoimmune hemolytic anemia (AIHA), Hemolytic transfusion reaction (HTR) เทคนิค Indirect anti globulin test ใช้ในการตรวจหา Alloantibodies ของผู้ป่วยที่จับกับเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง เทคนิคทั้งสองใช้น้ำยา Anti-human globulin (polyspecifics) ซึ่งประกอบด้วย Anti-human globulin และ Anti-complement คณะเทคนิคการแพทย์มีความสามารถที่จะผลิตน้ำยาในลักษณะ Rabbit polyclonal antibody ที่จำเพาะกับ Human globulin และ Human complement โดย Anti-human globulin ถูกผลิตโดยการฉีด human immunoglobulin ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วและตรวจหาความจำเพาะของ Antibody จากซีรัมกระจ่ายโดยเทคนิค Direct ELISA ส่วน Anti-human complement ถูกผลิตโดยใช้ Zymozan กระตุ้นให้เกิด Complement activation ในซีรัมหมู่ AB และเมื่อเติมเม็ดเลือดแดงจะเกิดการ Coated เมื่อนำ Complement coated RBC ไปฉีดกระจ่ายก็จะเกิดการสร้างแอนติบอดีต่อ Complement ต่างๆ ขึ้น การตรวจความจำเพาะของแอนติบอดีทำได้โดยดูการจับกลุ่มของ Complement coated cell Polyclonal antibody ทั้งสองถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Salting out โดยการใช้ Saturated ammonium sulfate, เทคนิค dialysis, เพิ่มความเข้มข้น ส่วน Heterophile antibody ถูกกำจัดโดยเทคนิค Adsorption technique ความเข้มข้นของ Anti-human globulin และ Anti-human complement หลังจากนำมาผสมในอัตราส่วน 1:4 คือ 3.62 และ 0.9 mg/ml ตามลำดับ การศึกษาคุณภาพความไวและความจำเพาะของ Anti-human globulin reagent polyspecifics ทำโดยใช้ซีรัมของผู้บริจาคโลหิต 300 รายในการตรวจ indirect anti globulin test และใช้ clotted blood ของผู้ป่วย 43 รายในการตรวจ Direct anti globulin test เปรียบเทียบผลจากทั้งสองเทคนิคกับ Commercial AHG reagent โดยค่าสถิติจากทั้งสองเทคนิคให้ผลคือ ($p>0.05$, $r=0.92$) บ่งบอกถึงน้ำยาทั้งสองแหล่งไม่มีความต่างกันวารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2549; 39: 8-14.

คำรหัส : Antigobulin test, anti-human globulin serum, Zymosan, heterophile antibodies

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** บริษัทแปซิฟิกไบโอเทค เลขที่ 6 ซอยสนธิวัฒนา 3 ลาดพร้าว 110 บางกะปิ กทม 10310

Abstract : Production of Anti-human Globulins (polyspecific) Reagent for Blood Banking Use

Yingtawan Tanvisut*, Jaturaporn Pornsinlapatip** Preeyanat Vongchan*

The antiglobulin test is commonly used in serological laboratory, especially blood bank. Direct antiglobulin test helps to investigate the antibody sensitized red cells *in vivo* including hemolytic disease of the newborn (HDN), autoimmune hemolytic anemia and transfusion reactions. In another aspect, indirect antiglobulin test is used to detect alloantibodies in patient sera *in vitro*. Both direct and indirect sensitized immunoglobulin can be observed by anti-human globulin (AHG) polyspecific reagent which contains anti-human globulin and anti-complement were produced. As facilities in production of in-house antibodies are available in our laboratory, we therefore produced rabbit polyclonal antibodies specific to human globulins and complement(s) were produced. The anti-human globulin was produced precisely by immunization of purified human globulins and the antibody level was detected by direct ELISA. The anti-human complement was produced in the same manner using zymozan as an inducer of complement activation pathway of AB serum from normal human. Hemagglutination of complement coated red blood cells was used to assay anti-complement in rabbit sera. Both polyclonal antibodies were then partially purified by salting out using saturated ammonium sulfate, dialyzed, concentrated and protein determined. Heterophile antibodies in anti-human globulin were eliminated by adsorption technique. Non-specific reaction in anti-human complement due to serum protein was decreased by dilution technique. The optimal ratio of both polyclonal antibodies was studied for their activities by hemagglutination using human anti-D sensitized cells. It was found that optimal concentration of anti-human globulin and anti-human complement is 3.62 and 0.9 mg/ml, respectively. The obtained antihuman globulin reagent (polyspecific) was then studied for its specificity and sensitivity in 300 donors serum samples by indirect antiglobulin test and 43 patients' cell samples by direct antiglobulin test compared to the commercial reagents together with the results from Blood Banking Unit, Maharaj Hospital, Chiang Mai. All 43 samples of direct anti-globulin test were showed with the commercial reagent and Blood banking unit. The finding showed no statistically significant difference between two reagents used ($p > 0.05$, $r = 0.92$). This preliminary study revealed the reliability of our in-house anti-human globulin reagent. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2006; 39: 8-14.**

Key words: Antiglobulin test, anti-human globulin serum, Zymosan, heterophile antibodies

* Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

** Biotech Co., Ltd. 6 Sonthiwattana 3, Ladprao 110, Bangkok, Bangkok 10310.

ที่มาและปัญหาวิจัย

น้ำยา Anti-human globulins (polyspecific) ใช้ตรวจหา incomplete antibodies ที่จับบน Antigen บนเม็ดเลือดแดง โดยไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่ม (agglutination) ได้ด้วยตัวเองโดย Anti-human globulins (polyspecific) ทำหน้าที่ Cross-link sensitized antibody ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่ม (Agglutination) มีการตรวจ 2 เทคนิคที่ใช้คือ Direct anti-globulin test เป็นการตรวจหา Antibody ที่จับกับ antigen บนเม็ดเลือดแดงอยู่แล้วในร่างกาย (*in vivo*) ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) Hemolytic disease of the newborn (HDN) Hemolytic transfusion reaction (HTR) และ Drug induced hemolytic anemia และ Indirect anti-globulin test ซึ่งเป็นการตรวจหา Antibody ใน Serum โดยนำเซลล์เม็ดแดงที่ทราบ Antigen โดย antibody ใน Serum จับกับ Antigen บนเม็ดเลือดแดงในหลอดทดลอง (*In vitro*) และ Anti-human globulins ทำหน้าที่ Cross-link sensitized antibody ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่ม (Agglutination) ใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดี (Antibody screening) ระบุแอนติบอดี (Antibody identification) การตรวจความเข้ากันได้ของเลือด (cross matching) และการศึกษาแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (Red cell phenotyping)

น้ำยา Anti-human globulins (polyspecific) ประกอบด้วยแอนติบอดี 2 ชนิดคือ Anti-human globulins ทำหน้าที่ Cross-link sensitized antibody ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่ม (Agglutination) และ Anti-human complement components ทำหน้าที่จับ Complement components ที่ติดบนเม็ดเลือดแดงซึ่งเกิดจากกลไก Complement fixation ซึ่งถูกกระตุ้นผ่าน Antigen-antibody complex (Classical pathway)

งานภาคินพนธ์ก่อนหน้านี้นี้ได้มีการผลิตแอนติบอดีทั้งสองชนิดและพิสูจน์ความจำเพาะแล้วว่าจำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นกระตุ้นคือ Human globulins และ Zymozan induced complement coated red cells ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำแอนติบอดีทั้งสองมารวมกันเพื่อผลิตน้ำยา Anti-human globulins (polyspecific) สำหรับการใช้อย่างเป็นรูปธรรมโดยอาศัยศักยภาพ

ที่มีอยู่ภายในคณะเทคนิคการแพทย์

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตน้ำยา Anti-human globulins (polyspecific) ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางธนาคารเลือด และห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา โดยใช้ศักยภาพที่มีอยู่ในคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการศึกษา

ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์

1.1 กำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกด้วยเทคนิค

Salting Out

พิสูจน์ activity ของซีรัมกระต่ายซึ่งได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย human Igs ก่อนด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ human Igs เคลือบเพลทข้ามคืน จากนั้น block non-specific binding sites ด้วย 5% BSA-PBST pH 7.2 เติมซีรัมกระต่ายและทิ้งให้ทำปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBST เติม HRP-conjugated swine anti-rabbit Igs ทำปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBST สุดท้ายเติม TMB-H₂O₂ substrate และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2N H₂SO₄ อ่านผลที่ 450 nm เปรียบเทียบกับ preimmunized และ post-immunized rabbit serum จากนั้นตกตะกอนโปรตีนอื่นทิ้งด้วยเทคนิค salting out โดยใช้ saturated (NH₄)₂SO₄ และตรวจวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยเทคนิค Lowry's method

1.2 การกำจัด Non-Specific antibodies

ใช้เม็ดเลือดแดงของคนปกติสุขภาพแข็งแรง ทั้งสามหมู่คือ A, B และ O จำนวนหมู่ละ 2 ราย ปั่นล้างเซลล์ด้วย NSS จำนวน 3 ครั้ง นำ packed red cells หมู่ A ผสมกับซีรัมกระต่ายจากข้อ 1.1 ในอัตราส่วน 1:2 ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาข้ามคืนในตู้เย็น ครอบคลุมกับเฉพาะซีรัม นำไปทำปฏิกิริยากับเซลล์ B และ O ต่อไปตามลำดับ จากนั้นทดสอบ adsorbed serum ด้วย 3% cell suspension หมู่เลือด A, B และ O เปรียบเทียบระหว่างซีรัมก่อน

และหลังการ adsorption

1.3 การกำจัด Anti-C4d (สำหรับ Anti-human complement components)

เตรียม C4d coated cells โดยเตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1 ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed C3b coated RBC (ข้อ 2.3) ปริมาตร 0.4 ml กับ working trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครอบคลุมบ้นล่าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

การทดสอบ activities ของ Antibodies ที่เตรียมได้

ทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่เตรียมได้ดังนี้ anti-human Igs ทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ดังแสดงในข้อ 1.1 และทดสอบกับ anti-D sensitized cells ด้วยเทคนิค agglutination เปรียบเทียบกับ commercial anti-human globulins (สภากาชาดไทย) สำหรับ anti-human complement ทดสอบโดยการเตรียม complement components (C3b, C3d, C4b) coated cells และให้ทำปฏิกิริยากับซีรัมด้วยเทคนิค agglutination ดังนี้

การเตรียม C3b coated red blood cells

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง บั่นแยกพลาสมาและเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ดูดน้ำเกลือทิ้ง เจือจางพลาสมาด้วยน้ำเกลือ 1:50 และนำพลาสมาที่เจือจางแล้วนี้ปริมาตร 2 ml เติมลงใน washed packed red cells จากนั้นเติม sensitizing diluent for C3b coating cells (เย็นและกวนอยู่ตลอดเวลา) ปริมาตร 39.6 ml และเติม 0.4M MgCl₂ ปริมาตร 0.2 ml ลงไปที่ ผสมกันบน magnetic plate ที่อุณหภูมิ 0 °C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาบ้นล่างเซลล์ 4 ครั้งด้วยน้ำเกลือ ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

การเตรียม C3d coated red blood cells

เตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1

ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed C3b coated RBC (ข้อ 2.1) ปริมาตร 0.4 ml กับ working trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครอบคลุมบ้นล่าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

การเตรียม C4b coated red blood cells

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดปริมาตร 2 ml ผสมกับ 10% sucrose ปริมาตร 20 ml ผสมให้เข้ากันและอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครอบคลุมบ้นล่าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัมกระต่าย

การเตรียม uncoated red blood cell

เจาะเลือดปริมาตร 4 ml โดยใช้ ACD เป็นสารกันเลือดแข็ง บั่นแยกพลาสมาและเซลล์ ล้างเซลล์ 4 ครั้ง ด้วย NSS ปรับเป็น 2% cell suspension ก่อนนำไปทดสอบกับซีรัมกระต่าย

การเตรียม trypsin treated red blood cell

เตรียม Working trypsin/HCl (1:10 trypsin/HCl, โดยการเจือจาง 1%w/v trypsin/0.05M HCl ปริมาตร 1 ml กับ 0.1M phosphate buffer ปริมาตร 9 ml) จากนั้นผสม packed red blood cell ปริมาตร 0.4 ml กับ working trypsin/HCl ปริมาตร 1.6 ml นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ครอบคลุมบ้นล่าง 4 ครั้ง ปรับความเข้มข้นเป็น 2% ด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับซีรัม กระต่าย

การทดสอบ Anti-complement ในซีรัม กระต่าย

เจือจางซีรัมกระต่ายด้วยน้ำเกลือแบบ serial ten-fold dilution นำซีรัมที่เจือจางดังกล่าวนี้จำนวน 2 หยด ผสมกับเม็ดเลือดแดงที่มีและไม่มีคอมพลีเมนต์เคลือบอยู่ในลักษณะต่างๆ จำนวน 1 หยด ทิ้งไว้ 5 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นบั่นอ่านผลการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย serofuge ผลการเกาะกลุ่มของ

เม็ดเลือดในหลอดทดสอบใดแสดงว่ามีแอนติบอดีจำเพาะต่อคอมพลีเมนต์ชนิดนั้นๆ ในซีรัม กระต่าย

การเตรียมน้ำยา Anti-human globulins (polyspecific)

นำแอนติบอดีทั้งสองชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ undiluted anti-human Igs และ 1:4 anti-human complement จากนั้นทดสอบกับ anti-D sensitized cells เปรียบเทียบกับ commercial AHG reagent (สภากาชาดไทย)

ทดสอบกับตัวอย่างของผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย

ทดสอบความแรงถูกต้องและความแรงของปฏิกิริยาในตัวอย่างเลือดผู้ป่วย (N=43) ด้วยเทคนิค direct anti-globulin test และในตัวอย่างเลือดผู้บริจาค (N=300) ด้วยเทคนิค indirect antiglobulin test เปรียบเทียบกับน้ำยา commercial AHG reagent และนำผลที่ได้ตรวจสอบกับผลการตรวจจริงโดยเจ้าหน้าที่งานธนาคารเลือด ทดสอบด้วยสถิติ Wilcoxon Signed rank test และ McNemar test ตามลำดับ

ผลการทดลอง

Anti-human Igs ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนอื่นๆ ออกแล้วและกำจัด non-specific antibodies ด้วยเทคนิค

multiple adsorption พบว่าปฏิกิริยาไม่จำเพาะหายไปหมดสิ้น (ตารางที่ 1) การศึกษา activity ของแอนติบอดีด้วย anti-D sensitized cells เปรียบเทียบกับน้ำยาของสภากาชาดไทยพบว่าน้ำยาที่ผลิตได้มีความแรงที่ 1:256 ต่ำกว่าที่ตรวจวัดได้ในน้ำยาของสภากาชาดไทยหนึ่งไตเตอร์ (1:512) การศึกษา activity ของ anti-human complement component พบว่ามี non-specific reaction กับเซลล์ A, B และ O เช่นเดียวกันจึงได้ทำการดูดซับออกด้วยเทคนิค multiple adsorption และกำจัด anti-C4d ออกด้วย C4d coated red cells ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาไม่จำเพาะซึ่งไม่ต้องการได้ถูกกำจัดออกไปเมื่อใช้ anti-human complement ที่เจือจาง 1:4 (ตารางที่ 2) และยังคงมีความจำเพาะต่อ C3b, C3d และ C4b coated cells ตามต้องการ (ตารางที่ 3) เมื่อนำแอนติบอดีทั้งสองชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ undiluted anti-human Igs และ 1:4 anti-human complement และตรวจสอบความแรงของปฏิกิริยากับ anti-D sensitized cells พบว่าให้ความแรงของปฏิกิริยาที่ 1:256 ต่ำกว่าน้ำยามาตรฐานหนึ่งไตเตอร์ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต พบว่าสามารถตรวจสอบได้ตรงกับน้ำยามาตรฐาน และผลการตรวจของเจ้าหน้าที่งานธนาคารเลือด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) น้ำยาทั้งสองชนิดให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกัน ($r=0.92$)

ตารางที่ 1 แสดงปฏิกิริยาต่อ anti-D sensitized cells ของ anti-human Igs ที่ผลิตได้ภายหลังการทำ multiple adsorption

Dilution/Cell	A1		A2		B1		B2		O1		O2	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
undiluted	3+	neg	2+	neg	3+	neg	2+	neg	2+	neg	2+	neg
1:2	2+	neg	2+	neg	2+	neg	2+	neg	2+	neg	1+	neg
1:4	1+	neg	2+	neg	2+	neg	1+	neg	1+	neg	1+	neg
1:8	neg	neg	1+	neg	1+	neg	1+	neg	1+	neg	1+	neg
1:16	neg	neg	1+	neg	1+	neg	neg	neg	neg	neg	1+	neg
1:32	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1:64	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1:128	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
1:256	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

ตารางที่ 2 แสดงปฏิกิริยาต่อ C4d coated red cells ของ anti-human complement ภายหลังการกำจัด anti-C4d antibodies

Dilution	Reaction with C4d coated cells pre-adsorption	Reaction with C4d coated cells post-adsorption
1:10	2+	Not determined
1:20	1+	Not determined
1:40	1+	Not determined
undilute	Not determined	Weak positive
1:2	Not determined	Weak positive
1:4	Not determined	negative

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบระหว่าง anti-complement กับ C3b, C3d และ C4b coated cells

Dilution	Cells coated with complement components					
	C3b	C3d	C4b	C4d	Trypsinized cells	Untreated cell
1:2	4+	2+	4+	Neg	Neg	Neg
1:4	4+	2+	3+	Neg	Neg	Neg
1:8	3+	1+	2+	ND	ND	ND
1:16	3+	1+	2+	ND	ND	ND
1:32	3+	Weak	1+	ND	ND	ND
1:64	2+	Neg	weak	ND	ND	ND
1:128	1+	Neg	ND	ND	ND	ND
1:256	Weak	ND	ND	ND	ND	ND
1:512	neg	ND	ND	ND	ND	ND

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผู้วิจัยสามารถผลิตน้ำยา anti-human globulins (polyspecific) ได้ตามวัตถุประสงค์ น้ำยาที่ผลิตได้มีความจำเพาะ ความไวเปรียบเทียบกับน้ำยามาตรฐานอัตราส่วนของผสม 1:1 โดยใช้ undiluted anti-human globulins และ 1:4 anti-human complement ความเข้มข้นโปรตีนในน้ำยาสำเร็จรูปพร้อมใช้ประกอบด้วย anti-human globulins 3.62 mg/ml และ anti-human complement 0.9 mg/ml น้ำยาที่ผลิตสามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและตัวอย่างเลือดผู้บริจาค ได้ผลเช่นเดียวกับน้ำยามาตรฐานที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$, $r = 0.92$)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก

โครงการ IRPUS ประจำปีการศึกษา 2548 (I4801002) และงบประมาณเงินรายได้คณะเทคนิคการแพทย์ ประจำปี 2546 ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ภาวิณี คุปตะวินทุ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้คำแนะนำและอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัม ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาค งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 284/2548

เอกสารอ้างอิง

Brecher ME. Technical Manual 14th Edition. American Association of Blood Banks. Maryland, 2003