J Med Biosci Vol. 3 No. 2 July - December 2021;69-77 DOI: 10.14456/J Med Biosci.2021.XX

Original article

Monoclonal Anti-P1 reagents: Potency and false positive reaction

Sarika Makechay*, Kanjana Aiemumporn, Suwit Phonimit, Jintana Tubrod, Udom Tingtoy

National Blood Center, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Abstract

Background: Anti-P1 naturally occurs; it is the less clinically significant IgM class and mainly found and optimally reactive at 4 - 25 °C. The anti-P1 that reacts at 37 °C is clinically significant and causes immediate and delayed hemolytic transfusion reactions. P_1- RBCs should be provided for patients. Therefore, P_1 antigen should be detected in donated blood and in patients with anti-P1.

Objective: To determine potency and false positive reaction of anti-P1 reagents used at the National Blood Center, Thai Red Cross Society.

***Methods*:** Six polyclonal anti-P1 reagents and six monoclonal anti-P1 reagents were produced from different clones. The potency test was performed on strong P_1 and weak P_1 red blood cells. These reagents were tested for false positive reactions with P_1-(T+) and P_1-(DAT+) red blood cells.

***Results*:** The six polyclonal anti-P1 reagents had a titer of 8; a total score ranging from 29 to 37 with strong P_1 cells and a titer of 4; a total score ranging from 18 to 23 with weak P_1 cells, respectively. The six monoclonal anti-P1 reagents had titers ranging from 16 to 256; a total score ranging from 50 to 91 with strong P_1 cells and titers ranging from 8 to 64; a total score ranging from 33 to 67 with weak P_1 cells. The four polyclonal anti-P1 reagents showed false positive reaction with P_1-(T+) red blood cells. Two of polyclonal anti-P1 reagents and all of six monoclonal anti-P1 reagents showed no false positive reaction with P_1-(T+) and P_1-(DAT+) red blood cells.

Conclusion: Monoclonal anti-P1 reagents had higher titers than polyclonal anti-P1 reagents and no false positive reaction with P_1-(T+) and P_1-(DAT+) red blood cells. As a result, these monoclonal anti-P1 reagents are appropriate for blood banking to detect P_1 antigen on red blood cells both of donors and patients.

Keywords: Monoclonal antibody, anti-P1 reagent.

***Correspondence to:** Sarika Makechay, Antisera and standard cells preparation section, National Blood Center, Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: sarika_sa@hotmail.co.th
Received: February 11, 2021
Revised: May 18, 2021
Accepted: June 10, 2021

นิพนธ์ต้นฉบับ

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต Monoclonal anti-P1: ความแรงและปฏิกิริยาผลบวกลวง

สาริกา เมฆฉาย*, กาญจนา เอี่ยมอัมพร, สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร์, จินตนา ทับรอด, อุดม ติ่งต้อย

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

เหตุผลของการทำวิจัย: Anti-P1 ร่างกายสามารถกระตุ้นให้สร้างได้เองตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่มักเป็นชนิด IgM ที่มีความสำคัญน้อยทางคลินิก และทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4 - 25°C ส่วน anti-P1 ที่ทำปฏิกิริยาที่ 37°C นั้นมีความสำคัญทางคลินิก และเป็นสาเหตุของ immediate และ delayed hemolytic transfusion reactions (HTRs) จึงควรพิจารณาให้เลือดที่มีแอนติเจน P_1- ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจหาแอนติเจน P_1 ในเลือดบริจาค และในผู้ป่วยที่มี anti-P1

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความแรงและปฏิกิริยาผลบวกลวงของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 ที่ศูนย์บริการโลหิตมีใช้อยู่ ณ ปัจจุบัน

วิธีการทำวิจัย: Polyclonal anti-P1 reagent จำนวน 6 ตัวอย่าง และชนิด monoclonal anti-P1 reagent จำนวน 6 ตัวอย่างที่ผลิตจากโคลนที่แตกต่างกัน นำมาทดสอบหาความแรง (titer) กับเซลล์ P_1 strong และ P_1 weak รวมทั้งทดสอบผลบวกลวงกับเซลล์ P_1-(T+) และ เซลล์ P_1- (DAT+)

ผลการศึกษา: Polyclonal anti-P1 reagent ทั้ง 6 ตัวอย่าง มี titer 8 คะแนนรวม 29 - 37 กับเซลล์ P_1 strong และมี titer 4 คะแนนรวม 18 - 23 กับเซลล์ P_1weak ส่วน monoclonal anti-P1 reagent จำนวน 6 ตัวอย่าง มี titer ระหว่าง 16 - 256 คะแนนรวม 50 - 91 กับเซลล์ P_1 strong และมี titer ระหว่าง 8 - 64 มีคะแนนรวมที่ 33 - 67 กับเซลล์ P_1weak และมี polyclonal anti-P1 reagent จำนวน 4 ตัวอย่าง (S1 และ S4) ที่ให้ผล false positive reaction กับเซลล์ P_1-(T+) อีก 2 ตัวอย่าง (S5 และS6) ไม่พบปฏิกิริยาผลบวกลวงกับทั้งเซลล์ P_1-(T+) และ P_1-(DAT+) เช่นเดียวกันกับ monoclonal anti-P1 reagent ทั้ง 6 ตัวอย่าง

สรุป: Monoclonal anti-P1 reagents มีผลความแรงมากกว่า polyclonal anti-P1 reagents อีกทั้งไม่พบปฏิกิริยาผลบวกลวงกับเซลล์ P_1-(T+) และ P_1-(DAT+) จึงแสดงให้เห็นว่า monoclonal anti-P1 reagents มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบทางธนาคารเลือด เพื่อตรวจหาแอนติเจน P_1 ทั้งในเลือดบริจาคและในผู้ป่วย

คำสำคัญ: Monoclonal antibody, anti-P1 reagent.

หมู่เลือดในระบบ P ถูกค้นพบในปีพ.ศ. 2470 โดย Landsteiner K. และในปีพ.ศ. 2533 คณะทำงานของ international society of blood transfusion (ISBT) กำหนดให้หมู่เลือดระบบ P มีแอนติเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอนติเจน P_1[1, 2] ส่วนแอนติเจน P, P^k และ LKE (Luke) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม GLOB collection ในปีพ.ศ. 2539 ปัจจุบันเรียกหมู่เลือดระบบนี้ว่าหมู่เลือดระบบ P และ GLOB collection[3, 4] หมู่เลือดระบบ P มี phenotype 5 ชนิดคือ P_1, P_2, P_1^k, P_2^k, และ p ซึ่งเป็น null phenotype พบได้ประมาณ 5.8 คนต่อประชากรหนึ่งล้านคนในยุโรป[5] P_1 phenotype ที่ประกอบด้วย แอนติเจน P_1, P, (P^k) ในคนผิวขาวพบได้ร้อยละ 79 ในคนผิวดำพบได้ร้อยละ 97 ซึ่งแตกต่างจากในประเทศไทยที่พบได้เพียงร้อยละ 27[6, 7] ส่วน P_2 phenotype ประกอบด้วยแอนติเจน P และ P^k จึงสร้าง anti-P1 ได้ สำหรับ anti-P1 ที่ร่างกายกระตุ้นให้สร้างได้เองตามธรรมชาติ พบได้บ่อยในคนที่เป็น P_1หรือ P_2 phenotype และมักเป็นชนิด IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4 - 25^{O}C มีความสำคัญทางคลินิกน้อย และมีความแรงแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ซึ่งลักษณะนี้สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ โดยทั่วไปแล้ว anti-P_1 จะมีปฏิกิริยาอ่อนๆ แต่อาจจะพบที่มี titer สูงได้ในผู้ป่วยโรค hydatid disease, โรคพยาธิใบไม้ในตับ (liver fluke disease) และโรคพังผืดในตับเฉียบพลัน (acute hepatic fascioliasis)[4] อีกทั้ง anti-P1 ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน P_1 โดยตรงทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 37^{O}C และ fix complement สามารถทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก และเป็นสาเหตุของ hemolytic transfusion reactions (HTRs) หลังการให้เลือดได้ โดยร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่มี anti-P1 titer สูงพบมีการทำลายเม็ดเลือดแดงอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาของ Smith D. พบว่าในระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2549 - 2558) พบ anti-P1 เป็นสาเหตุของ HTRs ได้ร้อยละ 0.07[8, 9] ในประเทศไทยโดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ anti-P1 ได้มากถึงร้อยละ 70 และพบร่วมกับ anti-Lewis ประมาณ ร้อยละ10[10] แม้ว่าส่วนใหญ่ anti-P1 จะมีความสำคัญน้อยทางคลินิก แต่เมื่อตรวจพบว่าผู้ป่วยมี anti-P_1 ควรพิจารณาให้เลือดที่มีแอนติเจน P_1(-) แก่ผู้ป่วย เพื่อหลีกเลี่ยงปฏิกิริยา HTRs ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยได้รับอันตรายได้ การตรวจกรองแอนติบอดีในผู้ป่วยจึงมีความสำคัญเช่นเดียวกัน ทำให้การเตรียม screening cells และ panel cells ที่นำมาใช้ตรวจกรองและตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี จะต้องมีแอนติเจน P_1(+) เพียงพอในทุกรุ่นการผลิต[11] ซึ่งการตรวจหาแอนติเจน P_1 ในเลือดบริจาคและในผู้ป่วย สิ่งสำคัญ คือการเลือกใช้ anti-P1 ที่เหมาะสม และไม่มีปฏิกิริยาผลบวกลวง ดังนั้นจึงต้องมีการประเมินคุณสมบัติของ anti-P1 ที่จะนำมาใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาความแรงและปฏิกิริยาผลบวกลวงของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยมีใช้อยู่ ณ ปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต

Polyclonal anti-P1 เตรียมจาก human plasma จำนวน 6 ตัวอย่างได้แก่ตัวอย่างที่ S1-S6

Monoclonal anti-P1 จำนวน 6 ตัวอย่างที่ผลิตจากโคลนที่แตกต่างกัน ได้แก่

- ตัวอย่างที่ S7 ผลิตจากโคลน G202
- ตัวอย่างที่ S8 และ S9 ผลิตจากโคลน 650
- ตัวอย่างที่ S10 ผลิตจากโคลน P3N1L100
- ตัวอย่างที่ S11 เป็น culture supernatant จากโคลน HIRO-59 (3D4)
- ตัวอย่างที่ S12 เป็น monoclonal anti-P1 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ผลิตจากโคลน 1C9 (ตารางที่ 1)

Antibody ที่สกัดจาก lectin ได้แก่ anti -T จาก ถั่งลิสง (*Arachis hypogaea) anti -T* จากถั่วเหลือง *(Glycine soja)* และ anti- A1 จาก *Dolichos biflorus* ซึ่งเตรียมเองในห้องปฏิบัติการ[12]

Anti-D(IgG) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เซลล์เม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิต

เซลล์เม็ดเลือดแดง P_1strong ได้จากเซลล์หมู่ O ที่มีแอนติเจน P_1+ และมีความแรง 3 – 4 + กับ anti-P1 และเซลล์เม็ดเลือดแดง P_1weak ได้จากเซลล์ หมู่ O ที่มีแอนติเจน P_1+ และมีความแรง 1 – 2 + กับ anti-P1

เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ O Rh(D+) ที่มีแอนติเจน P_1- โดยใช้ 1%BSA เป็นตัวทำละลาย

วิธีการ นำ anti-P1 ทั้ง 12 ตัวอย่าง มาทดสอบดังนี้

ทำการทดสอบหาความแรง (titer) โดยเจือจาง anti-P1 แบบ two fold serial dilution ด้วย 1% BSA และนำแต่ละ dilution มา 100 ไมโครลิตร ทดสอบกับเซลล์ P_1 strong และ P_1 weak ที่ล้างและเตรียมเป็น 2% cell suspension ใน normal saline ชนิดละ 100 ไมโครลิตร incubate ตามคำแนะนำของแต่ละบริษัท ดังตารางที่ 1 ปั่นอ่านผลที่ความเร็วรอบ 1,000 g นาน 15 วินาที บันทึกผลความแรงเป็นคะแนน (score)[13] และ dilution สุดท้ายที่ให้คะแนนความแรงเท่ากับ 5 บันทึกเป็น titer

จากนั้นทดสอบปฏิกิริยาผลบวกลวง กับเซลล์ P_1-(T+) โดยผสมเซลล์หมู่ O P_1- กับเอนไซม์ neuraminidase (sialidase) ในอัตราส่วนที่ เหมาะสม incubate ที่ 37^{O}C (treated cells) และนำเซลล์ที่ได้มาทดสอบ กับ anti-T ที่สกัดจาก lectin และ anti-A1 จาก *Dolichos biflorus* แล้วว่าเป็นเซลล์ T+ จริง จากนั้น นำเซลล์ P_1-(T+) ที่ได้มาเตรียมเป็น 3 - 5% cell suspension นำมา 1 หยด ทดสอบกับ anti-P1 จำนวน 1 - 2 หยด ตามคำแนะนำของแต่ละบริษัท incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่นอ่านผล ที่ความเร็วรอบ 1,000 g นาน 15 วินาที บันทึกผลความแรง จากนั้น incubate จนครบ 30 นาที ปั่นอ่านผลที่ความเร็วรอบ 1,000 g นาน 15 วินาที และบันทึกผลความแรง (ตารางที่ 1)

ทดสอบปฏิกิริยาผลบวกลวงกับเซลล์ P_1-(DAT+) จำนวน 24 ราย โดยการแบ่งเซลล์ P_1-(D+) แต่ละรายนำมาผสมกับ anti-D (IgG) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม และ incubate ที่อุณหภูมิ 37^{O}C (sensitization) และเมื่อทดสอบ DAT มีความแรง เป็น 3 - 4+ จากนั้น นำเซลล์ P_1-(DAT+) ที่ได้มาทดสอบกับ anti-P1 ทั้ง 12 ตัวอย่าง ตามคำแนะนำของแต่ละบริษัท (ตารางที่ 1) เปรียบเทียบกับเซลล์ P_1-(DAT-) คือ เซลล์ส่วนที่ไม่ได้ sensitize (unsensitized cells)

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความแรง (titer)

Polyclonal anti-P1 เมื่อทดสอบกับเซลล์ P_1 strong พบว่าตัวอย่างที่ S1 - S6 มี titer 8 คะแนนรวม 37, 35, 33, 29, 33 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับเซลล์ P_1 weak มี titer 4 คะแนนรวม 23, 18, 23, 18, 19 และ 23 ตามลำดับ

Monoclonal anti-P1 เมื่อทดสอบกับเซลล์ P_1 strong พบว่าตัวอย่างที่ S7 มี titer 128 คะแนนรวม 84 และเมื่อทดสอบ กับเซลล์ P_1 weak มี titer 32 คะแนนรวม 46 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ S8 และ S9 เป็นชนิด murine MoAb เมื่อทดสอบกับเซลล์ P_1 strong มี titer 16 และ 32 คะแนนรวม 50 และ 61 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับเซลล์ P_1 weak มี titer 8 และ 16 คะแนนรวม 33 และ 50 ตามลำดับ Anti-P1 ตัวอย่างที่ S10, S11 และ S12 ที่เป็นชนิด human MoAb ให้ผลความแรงกับเซลล์ P_1 strong ที่ titer 256, 128 และ 128 มีคะแนนรวม 91, 88 และ 88 ตามลำดับ กับเซลล์ P_1 weak ให้ผลความแรงที่ titer 64, 8 และ 64 คะแนนรวม 65, 57 และ 67 ตามลำดับ

ผลการทดสอบปฏิกิริยาผลบวกลวง

ผลการทดสอบกับเซลล์ P_1-(T+) พบว่า Polyclonal anti-P1 ตัวอย่างที่ S1-S4 ให้ผลบวก กับเซลล์ P_1-(T+) ทุกราย ส่วน anti-P1 ตัวอย่างที่ S5 และ S6 ให้ผลลบกับเซลล์ P_1-(T+) ทุกราย เช่นเดียวกันกับ Monoclonal anti-P1 ตัวอย่างที่ S7 -S12

ผลการทดสอบกับเซลล์ P_1-(DAT+) พบว่า Polyclonal anti-P1 ตัวอย่างที่ S1 - S6 และ Monoclonal anti-P1 ตัวอย่างที่ S7 - S12 ให้ผลลบเช่นเดียวกันทุกตัวอย่าง

อภิปรายผล

Anti-P1 ที่มีใช้อยู่ในขณะนี้นอกจากจะเตรียมได้จาก polyclonal antibody เช่น human plasma และการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง เช่น แพะ และกระต่ายแล้ว ยังผลิตได้จาก monoclonal antibody จากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ได้แก่ หนูทดลอง (murine monoclonal antibody: murine MoAb) และจากเม็ดเลือดขาวของคน (human monoclonal antibody: human MoAb) ซึ่งในปัจจุบันมี monoclonal anti-P1 เพียงไม่กี่โคลนที่นำมาใช้ผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 เพื่อจำหน่ายศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเอง ได้พัฒนาการผลิต anti-P1 จาก human MoAb ที่มีคุณภาพดี สามารถนำมาใช้ทดแทน anti-P1 ที่ได้จาก plasma ของผู้บริจาคโลหิตได้[14] เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของ anti-P1 ทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่างโดยมี polyclonal anti-P1 จำนวน 6 ตัวอย่าง (S1 - S6) ผลิตจาก plasma ของผู้บริจาคโลหิตที่มี anti-P1 และชนิด monoclonal antibody (MoAb) จำนวน 6 ตัวอย่าง (S7 - S12) โดยตัวอย่างที่ S7 ผลิตจาก โคลน G202 ซึ่งเป็น monoclonal anti-P1 ที่ไม่ทราบชนิด ตัวอย่างที่ S8 และ S9 ผลิตจากโคลน 650 เป็นชนิด murine MoAb ตัวอย่างที่ S10 ผลิตจากโคลน P3N1L100 ตัวอย่างที่ S11 ผลิตจากโคลน HIRO-59 (3D4) และตัวอย่างที่ S12 เป็น

anti-P1 reagent ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่ผลิตจากโคลน 1C9 (ตารางที่ 1) การศึกษานี้พบว่า polyclonal anti-P1 ทั้ง 6 ตัวอย่าง ให้ผลความแรง 8 มีคะแนน รวม 32 - 37 เฉลี่ยที่ 34 กับเซลล์ P_1 strong และมี titer 4 คะแนนรวม 18-23 เฉลี่ยที่ 20 กับเซลล์ P_1 weak ส่น monoclonal anti-P1 ทั้ง 6 ตัวอย่าง มี titer ตั้งแต่ 16 - 256 คะแนนรวม 50 - 91 กับเซลล์ P_1 strong โดยมีคะแนนของหลอดแรกที่มิได้เจือจาง (score at neat) เท่ากับ9 - 12 คะแนน และมี titer 8-64 คะแนนรวม 33 - 67 กับเซลล์ P_1 weak มี score at neat 7 - 10 คะแนน การที่ polyclonal anti-P1 ทั้ง 6 ตัวอย่าง มีผลความแรงต่ำกว่า monoclonal anti-P1 อาจเป็นเพราะ anti-P1 ที่ผลิตจาก human plasma เกิดจากการกระตุ้นโดยธรรมชาติ ไม่สามารถกำหนดให้มีความแรงตามต้องการได้ ซึ่งแตกต่างจาก monoclonal antibody ที่กำหนดให้มีความแรงตามต้องการได้ อย่างไรก็ตาม anti-P1 reagent ตัวอย่างที่ S8 และ S9 จากสองบริษัท แม้ว่าจะผลิตจากโคลน 650 เช่นเดียวกัน แต่มีผลความแรงแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากสูตรการผลิตที่แตกต่างกัน อีกทั้งบางบริษัทมีการเติมสารที่เป็น potentiator ได้แก่ bovine albumin ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป ตลอดจนวิธีการทดสอบ โดยทั้งตัวอย่าง S8 และ S9 ใช้อัตราส่วนของแอนติบอดีต่อเซลล์ 1:1 เช่นเดียวกัน แต่ตัวอย่าง S8 จะปั่นอ่านผลทันที (immediate spin) โดยไม่ต้องบ่ม (incubate) ในขณะที่ตัวอย่าง S9 แนะนำให้ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 - 10 นาทีจึงปั่นอ่านผล ซึ่งระยะเวลาในการ incubate ระยะเวลาการ incubate อาจช่วยทำให้มีปฏิกิริยาแรงขึ้นได้ จึงทำให้ผลความแรงของตัวอย่างที่ S9 มากกว่า S8 อยู่ 1 dilution ส่วน anti-P1 ตัวอย่างที่ S10 ผลิตจากโคลน P3N1L100 มี titer ที่ 256 กับเซลล์ P_1 strong และ 64 กับเซลล์ P_1 weak ซึ่งแรงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ จะมีข้อดีที่เมื่อนำมาใช้ทดสอบ จะทำให้สามารถตรวจพบแอนติเจน P_1 อ่อน ๆ ได้ดี (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม anti-P1 ทุกตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบ ให้ผลความแรงกับเซลล์ P_1 strong และเซลล์ P_1 weak ตามข้อกำหนด[15] และมี score at neat ที่ 12 คะแนนกับเซลล์ P_1 strong และ 10 - 12 คะแนนกับเซลล์ P_1 weak ส่วนผลการทดสอบปฏิกิริยาผลบวกลวง กับเซลล์ P_1-(T+) จากการย่อย ด้วยเอนไซม์ neuraminidase เพื่อให้เผยแอนติเจน T (T-cryptantigen) ที่ซ่อนอยู่ [16] การทดสอบ T-activation ทำได้โดยการนำเซลล์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ (treated cells) มาทดสอบด้วย anti-T ที่สกัดจาก Lectin ชนิดต่าง ๆ[12] ดังตัวอย่างในตารางที่ 3 จากผลการศึกษานี้พบว่า เซลล์ P_1-(T+) ทั้ง 6 รายให้ผลบวกกับ anti-T ที่สกัดจากถั่วลิสง และถั่วเหลือง ส่วนการทดสอบกับ *Dolichos biflorous* (ซึ่งนอกจากประกอบด้วย anti-A1 แล้วยังมีแอนติบอดีต่อแอนติเจน Cad แล้วให้ผลเป็นลบ (ตารางที่ 4) ดังนั้น treated cells ทั้ง 6 ราย จึงไม่มีแอนติเจน Cad แสดงว่าเป็นเซลล์ที่มีแอนติเจน P_1-(T+) จริง และเมื่อนำมาทดสอบกับ anti-P1 จากหลายแหล่งผลิต พบว่า polyclonal anti-P1 จำนวน 4 ตัวอย่าง (S1 - S4) ให้ผลบวกกับเซลล์ P_1-(T+) ทั้ง 6 ราย แสดงว่าใน anti-P1 มี anti-T ผสมอยู่ซึ่งเป็นสาเหตุของปฏิกิริยาผลบวกลวง (ตารางที่ 5) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Strobel E.[17] ซึ่งพบว่า polyclonal anti-P1 ส่วนใหญ่มีปฏิกิริยาผลบวกลวง กับเซลล์ที่มีแอนติเจน T+ ซึ่งในธรรมชาติการเผยแอนติเจน T+ มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ neuraminidase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น clostridium perfringens และ streptococcus pneumoniae, bacteroides, escherichia coli และแบคทีเรีย gram negative เช่น actinomyces และ influenza virus, vibrio chorlerae ที่สามารถสร้าง neuraminidase และ T-activation ในหลอดทดลอง โดย neuraminidase จะตัดย่อย neuraminic acid และเผย T-cryptantigen ซึ่งจะจับกับ anti-T (IgM) เป็นผลทำให้เกิด agglutination ภายในหลอดทดลอง และทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตกในร่างกายได้ แต่ปรากฏการณ์นี้ไม่คงทน อาจพบได้ภายใน 2 - 3 วัน หรือเป็นสัปดาห์ ส่วนที่คงอยู่นานเป็นเดือนจะพบได้น้อย[18] เมื่อนำ anti-P1 ที่มีปฏิกิริยาผลบวกลวง กับเซลล์ P_1-(T+) มาใช้ในการตรวจเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ จะให้ผลการตรวจเป็นผลบวกลวง เนื่องจากคุณสมบัติของเซลล์ผู้ป่วยที่มี T- activation จะทำปฏิกิริยากับ plasma ของผู้บริจาคทั่วไป (polyagglutination)[19, 20] อีกทั้งโดยธรรมชาติของ anti-T ในผู้ใหญ่ จะพบในผู้ที่มีแอนติเจน T ซึ่งทำให้เกิด autoagglutination และเม็ดเลือดแดงแตกได้บ้าง อย่างไรก็ตามการเกิด เม็ดเลือดแดงแตก ในผู้ป่วย อาจไม่ได้เกิดจาก T-activation เพียงอย่างเดียว แต่อาจเป็นผลมาจาก bacterial lecilninases หรือ disseminate intravascular coagulation (DIC)[16, 19] ส่วน polyclonal anti-P1 ตัวอย่างที่ S5 และ S6 และให้ผลลบกับเซลล์ P_1-(T+) ทั้ง 6 ราย เช่นเดียวกันกับ monoclonal anti-P1 ทุกตัวอย่าง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบหาแอนติเจน P_1 ในผู้ป่วยหรือผู้บริจาคได้ดี โดยจะไม่พบแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่มีอุบัติการณ์ต่ำ (low

incidence) หรือ T-cryptantigen ซึ่งมักจะพบใน polyclonal antibody ส่วนปฏิกิริยาผลบวกลวง กับเซลล์ P_1-(DAT+) จำนวน 24 ราย พบว่า anti-P1 ทุกตัวอย่าง ทั้งที่เป็น polyclonal Ab และ monoclonal Ab ให้ผลการตรวจเป็นลบกับเซลล์ P_1-(DAT+) ทั้ง 24 ราย (ตารางที่ 6) จากการศึกษานี้พบว่า monoclonal anti-P1 ทั้ง 12 ตัวอย่างมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหาแอนติเจน P_1 ในผู้ป่วยที่มี DAT+ ได้ โดยไม่ต้องใช้ elution technique โดยเฉพาะอย่างยิ่ง monoclonal anti-P1 ที่ไม่พบปฏิกิริยาผลบวกลวงกับ DAT+ red blood cells และ T-activation red blood cells

ตารางที่ 1. น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 และสภาวะการทดสอบ

Anti-P1	โคลน	แหล่งที่มา	วิธีการทดสอบ
S-1	Human plasma	Polyclonal Ab.	
S-2	Human plasma	Polyclonal Ab.	
S-3	Human plasma	Polyclonal Ab.	Serum: cells (2:1), RT 30 minutes and spin
S-4	Human plasma	Polyclonal Ab.	
S-5	Human plasma	Polyclonal Ab.	
S-6	Human plasma	Polyclonal Ab.	
S-7	G 202	MoAb.	Serum: cells (1:1), RT 5-10 minutes and spin
S-8	650	Murine MoAb.	Serum: cells (1:1), Immediate spin
S-9	650	Murine MoAb.	Serum: cells (1:1), RT 5-10 minutes and spin
S-10	P3N1L100	Human MoAb.	Serum: cells (1:1), Immediate spin
S-11	HIRO-59 (3D4)	Human MoAb.	Serum: cells (1:1), RT 5-10 minutes and spin
S-12	1C9	Human MoAb.	Serum: cells (1:1), RT 5-10 minutes and spin

ตารางที่ 2. ความแรงของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 เมื่อทดสอบกับ เซลล์เม็ดเลือดแดง ชนิด P_1+

น้ำยา	เซลล์ P_1 strong			เซลล์ P_1 weak		
anti-P1	ไตเตอร์	คะแนน	คะแนนที่ไม่ได้เจือจาง	ไตเตอร์	คะแนน	คะแนนที่ไม่ได้เจือจาง
S-1	8	35	11	4	18	8
S-2	8	33	12	4	20	8
S-3	8	35	11	4	18	8
S-4	8	29	9	2	14	7
S-5	8	33	10	4	19	8
S-6	8	36	12	4	23	10
S-7	128	84	12	32	46	10
S-8	16	50	12	8	33	10
S-9	32	61	12	16	50	12
S-10	256	91	12	64	65	12
S-11	128	88	12	8	57	12
S-12	128	88	12	64	67	12

ตารางที่ 3. ปฏิกิริยาระหว่าง lectins และ polyagglutinable red blood cells. (AABB technical manual:2008)[12]

Lectin / reagent	T	Th	Tk	Tn	Cad
*Arachis hypogaea**	+	+	+	-	-
Dolichos biflorus[t]	-	-	-	+	+
*Glycine max (soja)**	+	-	-	+	+
Salvia sclarea	-	-	-	+	-
Salvia horminum	-	-	-	+	+

*T and Th cells give weaker reactions with *Arachis* after protease treatment,

Tk reactivity is enhanced after protease treatment,

[t] A and AB cells may react due to anti-A reactivity of *Dolichos* Lectin

ตารางที่ 4. ปฏิกิริยาของแอนติบอดีที่เตรียมจาก lectins เมื่อทดสอบกับ เซลล์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ neuraminidase

แอนติบอดีที่	**เซลล์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์**						**เซลล์ที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์**					
เตรียมจาก Lectins	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Arachis hypogaea	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	0	0	0	0
Glycine soja	4+	1+	3+	4+	4+	2+	0	0	0	0	0	0
Dolichos biflorus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5. ปฏิกิริยาของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 กับเซลล์ P_1- (T+)

Anti-P1	**เซลล์ P_1- (T+) ตั้ง 5 นาที ปั่นอ่านผล**						**เซลล์ P_1- (T+) ตั้ง 30 นาที ปั่นอ่านผล**					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
S-1	1+	1^s+	1+	1+	1^s+	1+	1^s+	2+	1^s+	1+	2+	1^s+
S-2	1^w+	1^s+	1^w+	1^w+	2+	1^s+	1^w+	2^s+	2+	1^w+	2^s+	2+
S-3	1+	1^s+	1+	1+	1^s+	1+	1^s+	2+	1^s+	1+	2+	1^s+
S-4	1+	1^s+	1+	1+	1^s+	1+	1^s+	2+	1^s+	1+	2+	1^s+
S-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 6. ปฏิกิริยาของน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-P1 กับเซลล์ P_1- (DAT+)

Anti-P1	จำนวน	เซลล์ P_1- (DAT+)		N	เซลล์ P_1- (DAT-)	
		ผลลบ	ผลบวก		ผลลบ	ผลบวก
S-1	24	24	0	24	24	0
S-2	24	24	0	24	24	0
S-3	24	24	0	24	24	0
S-4	24	24	0	24	24	0
S-5	24	24	0	24	24	0
S-6	24	24	0	24	24	0
S-7	24	24	0	24	24	0
S-8	24	24	0	24	24	0
S-9	24	24	0	24	24	0
S-10	24	24	0	24	24	0
S-11	24	24	0	24	24	0
S-12	24	24	0	24	24	0

สรุป

Monoclonal anti-P1 ทั้งที่ได้จากหนู (murine MoAb) และได้จากมนุษย์ (human MoAb) มีความแรงแตกต่างกันบ้าง อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของแอนติบอดีแต่ละโคลนและสูตรการผลิตที่มีความจำเพาะของแต่ละบริษัทอย่างไรก็ตาม monoclonal anti-P1 เหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาแอนติเจน P_1 ได้ดีกว่าชนิด polyclonal antibody อีกทั้งไม่พบผลบวกลวงกับเซลล์ P_1-(T+) และ P_1-(DAT+) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหาแอนติเจน P_1 ที่มีความแรงของแอนติเจนแตกต่างกันในแต่ละบุคคลได้ดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, JØrgensen J, Judd WJ, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. Vox Sang 2004;87: 304-16.
2. Bejrachandra S. Review of P blood group system. J Hematol Transfus Med 2005;15:83-8.
3. Kaczmarek R, Buczkowska A, Mikolajewicz K, Krotkiewski H, Czerwinski M. P1PK, GLOB and FORS blood group systems and GLOB collection: Biochemical and clinical aspects. Do we understand it all yet?. Transfus Med Rev 2014;28: 126-36.
4. Reid ME, Lomas-Francis C. The blood group antigen Factsbook. 2nd ed. London: Academic Press, 2003.
5. Hellberg A. Studies on the genetics basis of Pk, P and P1 blood group antigen expression. [dissertation]. Lund: Lund University;2007.
6. Chandanayingyong D. Transfusion medicine. Bangkok:Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University; 1998.
7. Bejrachandra S, Nathalang O, Saipin J, Kuvanont S, Wichitchinda K, Vongpattranon A. Distribution of blood group systems in Thai blood donors determined by the gel test. Siriraj Hosp Gaz 2002; 54:403-9.
8. Smith D, Aye T, See L, Nester T, Delaney M. Acute Hemolytic Transfusion Reaction due to Anti-P1:

A Case Report and Review of Institutional Experience. Transfus Med Hemother 2019;46:381-4.

9. Arndt PA, Garratty G, Marfoe RA, Zeger GD. An acute hemolytic transfusion reaction caused by an anti-P1 that reacted at 37 degrees C. Transfusion 1998;38: 373-7.
10. Romphruk AV, Wanhagij C, Akahat J, Tantanapornkul P, Anuphan T, Pattayaso P, et al. Anti-P1: the most common unexpected antibodies in northeastern-Thais. J Med Assoc Thai 1999;82:803-7.
11. Sakuldamrongpanich T. Production screening cells and panel cells of National Blood Center, Thai Red Cross Society. J Hematol Transfus Med 2013;23:153-60.
12. Preparing and using Lectins. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, editors. Technical manual. 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2008. p.890-92.
13. Reading and grading tube agglutination. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2008.p.876.
14. Tingtoy U, Makechay S, Deesin P, Tubrod J. Production of human monoclonal anti- P1 by using hybridoma technique. J Hematol Transfus Med 2017; 27:11-8.
15. Joint UKBTS/HPA Professional Advisory Committee. Reagents manufacture. In: Joint UKBTS/HPA Professional Advisory Committee, editors. Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom 8th ed. London: Stationery Office;2013. p.182-212.
16. Ramasethu J, Luban N. T activation, Br J Haematology 2001;112:259-63.
17. Strobel E. Comparison of monoclonal and polyclonal anti-P1 reagents. Clin Lab 2001;47: 249-55.
18. Massey E. Diagnosis and management of T Antigen Activation Reviewed [Internet]. 2006 [cited 2020 Jan 10]. Available from: https://nhsbtdbe.blob.core.windows.net/umbraco-assets-corp/ 14868/f62ef923-2fa0-4bea-82c1-c43989b7e111.pdf
19. Beck ML. Red blood cell polyagglutination: Clinical aspects. Semin Hematol 2000;37:186-96.
20. Melland C1, Hintz C. Detecting polyagglutinable red blood cells. Immunohematology 2018;34: 113-7.