

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและพัฒนาวัคซีนแอนติแคนายโกลบูลิน (โพลีस्पไซฟิก) ที่มี  
ประสิทธิภาพเพื่อใช้ตรวจความเข้ากันได้ของเลือดสุนัขและติดตาม  
ปฏิกิริยาหลังการให้เลือด

ผู้เขียน นายชัชวาล ศรีวิชัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สัตวแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ปรียานาถ วงศ์จันทร์	ประธานกรรมการ
ผศ. นสพ. ดร. กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์	กรรมการ

### บทคัดย่อ

Antiglobulin test เป็นวิธีการที่ใช้ในทางนำเหลืองวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่ไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง มีทั้งการตรวจทางตรง (direct antiglobulin test) ซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงอยู่แล้วในร่างกาย (*In vitro*) และการตรวจทางอ้อม (indirect antiglobulin test) ที่เป็นการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม ใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดี (antibody screening) และการตรวจความเข้ากันได้ของเลือด (crossmatching) การตรวจความเข้ากันได้ของเลือดก่อนการให้เลือดในสุนัข จำเป็นต้องใช้ แอนติบอดีที่สองที่มีความจำเพาะต่อ โกลบูลินของสุนัข (anti-canine globulins) เพื่อช่วยสานร่างแหของ sensitized red cells ให้เกิดการเกาะกลุ่มมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และเนื่องจากแอนติบอดีชนิด IgG สามารถตรึง คอมพลีเมนต์ได้ ดังนั้นการใช้วัคซีน anti-canine globulin (polyspecific) ที่มี anti-canine complement เป็นส่วนประกอบ จะช่วยทำให้การตรวจความเข้ากันได้ของเลือดระหว่างสุนัขผู้ให้และสุนัขผู้รับมีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ช่วยลดโอกาสของการให้เลือดที่ไม่เหมาะสมและอาจเกิดปฏิกิริยาอันไม่พึงประสงค์หลังการให้เลือด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ผลิต Rabbit polyclonal anti-canine globulins (polyspecific) โดยการเตรียม canine globulins ทำให้บริสุทธิ์ ถัดกระตุ่นกระต่ายและตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายโดยเทคนิค indirect ELISA จากนั้นกำจัด Heterophile antibody โดยการดูดซับด้วยเม็ดเลือดแดงสุนัขปกติ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Salting out และ Melon™ gel ตามลำดับ และทำให้

เข้มข้น ทดสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของน้ำยาที่ผลิตขึ้นกับเม็ดเลือดแดงที่เคลือบด้วยโกลบูลินของสุนัข จากนั้นผลิต anti-canine complement โดยกระตุ้นกระต่ายด้วยคอมพลีเมนต์สุนัขซึ่งได้จากการกระตุ้นด้วย Zymosan A ตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายโดยเทคนิค agglutination สังเกตการณ์จับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของสุนัขที่เคลือบด้วยคอมพลีเมนต์ต่าง ๆ จากนั้นผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน ทดสอบคุณสมบัติและความจำเพาะกับเม็ดเลือดแดงที่เคลือบด้วยคอมพลีเมนต์ชนิดต่าง ๆ และตัวอย่างเลือดสุนัขป่วยและสุนัขปกติ เปรียบเทียบกับน้ำยาที่มีจำหน่าย โดยศึกษาใน ตัวอย่างที่เข้ารับการรักษา ที่โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คลินิกและโรงพยาบาลสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2552 ถึง มีนาคม 2553 จำนวน 126 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า การตรวจทางตรงและทางอ้อมด้วยน้ำยาทั้ง 2 ชนิด ให้ผลสอดคล้องกันในระดับ “ดี” ( $kappa = 0.821$  และ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) สรุปผลจากการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพของน้ำยา anti-canine globulins (polyspecific) ที่ผลิตขึ้นและ commercial anti-canine globulins (polyspecific) มีความสอดคล้องและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงมีแนวโน้มที่ดีในการผลิตเพื่อนำมาใช้ทางคลินิกต่อไปในอนาคต การวิจัยนี้จึงเป็นการส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ใช้เองในประเทศ เพื่อลดการนำเข้า มีการนำความรู้และเทคนิคในห้องปฏิบัติการที่ใช้กับมนุษย์มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการดูแลรักษาสุนัขในโรงพยาบาลสัตว์ เพื่อให้การวินิจฉัยและการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่าย

<b>Thesis Title</b>	Production and Development of Effective Anti-canine Globulins (Polyspecific) Reagent for Canine Crossmathching and Monitoring of Transfusion Reaction	
<b>Author</b>	Mr. Chatchawan Sriwichai	
<b>Degree</b>	Master of Science (Veterinary Science)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Preeyanat Vongchan	Chairperson
	Asst. Prof. Dr. Korakot Nganvongpanit	Member

### ABSTRACT

The antiglobulin test is commonly used in serological laboratory and two types of test are available. Direct antiglobulin test helps to investigate the antibody sensitized red cells *in vivo* while indirect antiglobulin test is beneficial for the detection of free antibodies in serum and used for antibody screening and crossmatching. As in human, canine crossmatching, needs anti-canine globulin antibody to promote the lattice formation and agglutination of red blood cells by indirect antiglobulin test which can be easily observed. However, most Immunoglobulin G antibody specific to red blood cell antigen usually fixes complement. Anti-canine globulins (polyspecific) which composed of anti-canine globulins and anti-canine complement components, therefore, would be more appropriate in crossmatching to prevent post-transfusion reaction. The aim of this study was to produce both rabbit anti-canine globulins and anti-canine complement components and develop anti-canine globulins (polyspecific). In this study, canine globulins were isolated, purified and used to immunize rabbit to produce rabbit anti-canine globulins. Canine complement components obtained by Zymosan A was used to immunize the rabbit. The rising titers of rabbit anti-canine globulins and anti-canine component components were performed by indirect ELISA and agglutination, respectively. Heterophile antibody in rabbit serum was adsorbed out by normal canine red blood cells before any assay. Both antibodies were studied for their purity, protein

concentration and specificity prior to combine 1:1 (v/v) and used to investigate for their clinical advantages in canine blood samples in terms of direct and indirect antiglobulin test. Canine blood samples (n=126) were collected from Small Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Animal clinics and hospitals in Chiang Mai during October 2009 to March 2010. Comparison of anti-canine globulins produced in our laboratory and Coombs' reagent (VMRD Inc.) showed "good" correlation ( $\kappa = 0.821$ ) with no significant difference ( $p > 0.05$ ). Taken together, we proposed that both rabbit anti-canine globulins, anti-canine complement components and antibodies in polyspecific form could be produced and developed in our laboratory. Moreover, the antibodies could help in canine crossmatching to prevent post-transfusion reaction. Anti-canine globulin reagent is available in market. However, it is quite expensive and leads to increase in cost expense of laboratory investigation. Therefore, it is an urgent need to promote the industry-scale production in order to reduce import of expensive reagents as well as to provide both specific investigation and diagnosis for canine in small animal hospital.