

การเตรียมซีรัมเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibody
ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิก, น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำและเอนไซม์ปาเปน

VIRTUAL SERUM PREPARATION FOR UNEXPECTED ANTIBODY SCREENING
IN MEDIA OF ISOTONIC SALINE SOLUTION, LOW IONIC STRENGTH SALINE
SOLUTION AND PAPAIN ENZYME

อังสนา โยธินารักษ์¹, เยาวลักษณ์ พิมายนอก¹, ศรัณย์ธรรม ภูริจารูยางกูร¹, ก้องกริช ศรีบุรินทร์²,
กฤตพัชร เกียรติ รุ่งเรือง¹, สมพล แพรพันธ์¹, จิราภรณ์ เกตุดี^{*1}
Aungsana Yothinarak¹, Yaowaluk Pimainog¹, Saranthum Phurijaruyangkun¹, Kongkrit Sriburin²,
Kritapat Kietrungruang¹, Somphon phraephan¹, Jiraporn Gatedee^{*1}

^{*1} คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

² สถาบันกีฬา มหาวิทยาลัยรังสิต

^{*1} Faculty of Medical Technology, Rangsit University

² Sports Institute, Rangsit University

*E-mail ผู้รับผิดชอบบทความ (Corresponding Author): Jiraporn.g@rsu.ac.th

วันที่รับบทความ 6 ตุลาคม 2568 วันที่แก้ไขบทความ 26 พฤศจิกายน 2568 วันที่ตอบรับบทความ 27 พฤศจิกายน 2568

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมซีรัมเสมือนจริงให้มีสีเหลือง สีเหลืองอ่อนและสีเหลืองเข้ม เสมือนกับสีของซีรัมจริงที่ได้จากเลือดของมนุษย์ เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการวิชา วิทยาศาสตร์การบริการ โลหิต ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เรื่อง การตรวจกรองแอนติบอดีต่อหมู่เลือด ชนิด unexpected antibodies (unexpected antibody screening) ผลการทดสอบพบว่าซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองเข้ม เมื่อดูด้วยตาเปล่าพบว่า มีความขุ่นมากกว่าสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน ผลของการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง พบว่า ซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 แบบ คือ สีเหลือง สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองเข้ม มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนค่าความถ่วงจำเพาะ พบว่าซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อน มีค่าความถ่วงจำเพาะที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองและสีเหลืองเข้ม ผลการทดสอบ antibody screening ในทุกตัวกลาง พบว่าซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 แบบ ที่ไม่เติม anti-D (IgG) ให้ผลการทดสอบเป็นลบจริงและไม่เกิดผลบวกปลอม ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลการทดสอบเป็นบวกจริงและไม่เกิดผลบวกปลอม สรุปซีรัมเสมือนจริงสีเหลือง สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองเข้ม ให้ลักษณะสีเหลืองและความขุ่นที่ต่างกัน ทำให้สามารถเตรียมเป็นสิ่งตัวอย่างได้หลายตัวอย่างที่มีลักษณะทางกายภาพด้านสีและความขุ่นที่เสมือนกับซีรัมจริง

ที่ได้จากมนุษย์ เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่อง antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค, น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ปาเปน ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ซีรัมเสมือนจริง; การตรวจกรองแอนติบอดี; น้ำเกลือไอโซโทนิค; น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ; เอนไซม์ปาเปน

ABSTRACT

This study aimed to develop virtual serum in three distinct appearances such as yellow, light yellow, and turbid yellow that similarly the actual serum obtained from human blood. The virtual serum was designed for use in the laboratory teaching of the Transfusion Science subject at the Faculty of Medical Technology, Rangsit University in the topic of antibody screening for unexpected antibodies detection. The results showed that virtual serum with turbid yellow color by naked eye observation was more turbid than the yellow and light yellow. The comparison of absorbance values revealed statistically significant differences among all three virtual serum ($p < 0.05$). Results of specific gravity showed that the light-yellow virtual serum demonstrated a statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with the yellow and turbid yellow virtual serum. Antibody screening results demonstrated that all virtual serum without anti-D (IgG) yielded true negative outcomes with no false positives. Conversely, the virtual sera supplemented with anti-D (IgG) showed true positive results without false negatives in all testing media. In conclusion, the developed virtual serum such as yellow, light yellow, and turbid yellow exhibited different shades and turbidity characteristics similar to real human serum. This virtual serum can be effectively and efficiently used as practical teaching materials for antibody screening in isotonic saline solution, low ionic strength saline solution, and papain enzyme media. The proposed model provides a valuable educational tool for laboratory training in blood banking techniques.

Keywords: virtual serum; antibody screening; isotonic saline solution; low ionic strength saline solution; papain enzyme

1. บทนำ

Antibody screening คือการทดสอบเพื่อตรวจหา unexpected antibodies ที่มีความสำคัญทางด้านคลินิก โดยทำในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ผู้ป่วยที่จะรับเลือด ผู้ป่วยที่เกิดปฏิกิริยาอันไม่พึงประสงค์จากการรับเลือด ผู้บริจาคโลหิต และหญิงมีครรภ์ที่มีประวัติว่าเคยมีบุตรตาเหลือง ตัวเหลือง มีประวัติการแท้ง หรือได้รับเลือดมาก่อนตั้งครรภ์แล้วหลายหน การที่จะตรวจหา unexpected antibodies ที่มีความสำคัญทางด้านคลินิกให้ได้มากที่สุดนั้นจะมีการใช้ตัวกลางที่ช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ได้แก่ น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ (low-ionic strength solution (LISS)), bovine serum albumin (BSA), polyethylene glycol (PEG), proteolytic enzymes และ polycations

โดยแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ทั้งนี้เทคนิคที่ใช้ในการทำ antibody screening ในงานธนาคารเลือดส่วนมากจะใช้ saline test ซึ่งจะไม่มีความเสี่ยงจากสารต่าง ๆ ที่อาจรบกวนปฏิกิริยา แต่วิธีนี้ขาดความไว (sensitivity) ในการทดสอบ จึงมักใช้เทคนิคที่มีความไวที่ดีมากควบคู่กับ saline test เช่น LISS test, enzyme technique เป็นต้น

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต มีหัวข้อเรื่อง antibody screening ซึ่งการทดสอบดังกล่าวต้องมีการใช้สิ่งตัวอย่างชนิดซีรัม ซึ่งการเตรียมสิ่งตัวอย่างชนิดซีรัมเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เลือดครบส่วนปริมาณมากเพื่อนำมาปั่นแยกซีรัมออกมา จึงจะเพียงพอแก่นักศึกษาชั้นปีที่ 3 จำนวน 180 คน ทั้งนี้การเจาะเลือดจากมนุษย์ในปริมาณมาก ไม่สามารถทำได้เพราะอาจเป็นอันตรายต่อผู้ถูกเจาะ นอกจากนี้ unexpected antibody ในบางกลุ่มประชากรพบได้น้อย โดยมีการพบได้ร้อยละ 0.3 - 38.0 การพบร้อยละที่แตกต่างกันนั้นขึ้นกับกลุ่มประชากรและวิธีการทดสอบที่ใช้ [1] และซีรัมยังเป็นสิ่งตัวอย่างที่อาจเสี่ยงต่อโรคติดต่อจากการรับเลือด เช่น เชื้อตับอักเสบบี ซีและเชื้อเอชวี (HBV, HCV, HIV) [2] ซึ่งมีอันตรายต่อนักศึกษาที่ทำการฝึกตรวจ antibody screening

อังสนาและคณะ [3] ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเตรียมซีรัมเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibodies ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค ผลที่ได้จากการศึกษานี้ ทำให้ผู้สอนมีทางเลือกที่จะเตรียมซีรัมเสมือนจริงเพื่อทดแทนการใช้ pooled serum หรือ frozen plasma ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อจากเลือดของมนุษย์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบปัญหาบางอย่างในการทดสอบ antibody screening คือซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลลบบางส่วนทำให้เกิดเลือดแดงตกในขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาในปี 2561 อังสนา โยธินารักษ์ ได้มีการพัฒนาการเตรียมซีรัมเสมือนจริงโดยเพิ่มการเติมอัลบูมิน โดยนำมาทำเป็นสิ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบและผลบวกในการทดสอบ antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ปาเปน ผลการทดลองพบว่าซีรัมเสมือนจริงไม่ทำให้เกิดเลือดแดงตกในตัวกลางทั้งสามในทุกขั้นตอนของการทดสอบ [4] และในปี 2568 มีการลดจำนวนของสารอัลบูมินซึ่งมีราคาแพง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย และมีการเจือจางซีรัมเสมือนจริงเพื่อให้ได้สีของซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองจนถึงสีเหลืองอ่อน เพื่อนำมาใช้ทำสิ่งตัวอย่างได้หลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มของสีเหลืองที่ต่างกัน [5]

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจเรื่อง Routine to Research (R2R) ซึ่งเป็นการนำเอาปัญหาที่พบในงานประจำวันมาเข้าสู่งานวิจัยเพื่อหาแนวทางแก้ไขและนำไปพัฒนางานประจำให้ดีขึ้น โดยต้องมีการวางแผนและการดำเนินงานวิจัยที่ถูกต้องตามหลักวิชาการเพื่อให้ได้คำตอบที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด [6] งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ลดปริมาณของอัลบูมิน ที่มีสีเหลือง สีสเหลืองอ่อน และพัฒนาซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองให้มีความขุ่นมากขึ้น และศึกษาการพบผลบวกปลอมและผลลบปลอมในการทดสอบ antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ปาเปน

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลลบในการทดสอบ antibody screening

3.1.1 การเตรียมซีรัมเสมือนจริง จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ซีเหลืองดั้งเดิม, สูตรที่ 2 ซีเหลืองอ่อน และ สูตรที่ 3 ซีเหลืองขุ่น ทำตามงานวิจัยของอังสนาและคณะ [5] ดังนี้

1) สูตรที่ 1 ซีเหลืองดั้งเดิม

ชั่งผงแก๊กฮวย 6 กรัม, NaCl 0.85 กรัม และอัลบูมิน 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่า ส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 3 นาที เติมน้ำผสมอาหารสีเหลืองไข่ 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 3 นาที

2) สูตรที่ 2 ซีเหลืองอ่อน

เตรียมตัวเจือจางซีรัมเสมือนจริง โดยการชั่งอัลบูมิน 0.1 กรัม, NaCl 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 3 นาที จะได้ 0.1% อัลบูมิน (w/v) จากนั้นเจือจางซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 ให้มีอัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1:4 โดยการนำซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 จำนวน 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 0.1% อัลบูมิน (w/v) 60 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 3 นาที

3) สูตรที่ 3 ซีเหลืองขุ่น

เตรียมตัวเจือจางซีรัมเสมือนจริง เหมือนข้อ 1 และความขุ่น โดยชั่ง stock coffee mate 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate จนเดือด จะได้เป็น stock coffee mate จากนั้นซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 จำนวน 100 มิลลิลิตร ตู้ออก 150 มิลลิลิตร เติม stock coffee mate 150 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 3 นาที

3.1.2 ดูลักษณะทางกายภาพของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร จากข้อ 3.1.1 ทางด้านสี ความใสและความขุ่นด้วย ตาเปล่า วัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm จำนวน 30 ครั้ง และ ค่า specific gravity (Sp.gr.) จำนวน 30 ครั้ง

3.1.3 ทำการทดสอบ antibody screening โดยวิธีหลอดทดลองโดยใช้ซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร จากข้อ 3.1.1 จำนวน 30 ครั้ง และตรวจสอบผลการทดลองว่าให้ผลเป็นลบทุกสถานะของการทดสอบที่ RT, 37 °C และ antiglobulin phase

3.2 การเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลบวกในการทดสอบ antibody screening

3.2.1 การเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลบวก จำนวน 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 ซีเหลืองดั้งเดิม, สูตรที่ 2 ซีเหลืองอ่อน และสูตรที่ 3 ซีเหลืองขุ่น มีวิธีการเตรียมตามงานวิจัยของอังสนาและคณะ [5] ดังนี้

1) สูตรที่ 1 และ 3

เจือจาง anti-D (IgG) ด้วยซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 และ 3 จากข้อ 3.1 ที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:8 เพื่อให้ได้ผลบวกที่เกรดของ agglutination เท่ากับ 2+ - 3+

2) สูตรที่ 2

นำซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลบวกสูตรที่ 1 มาเจือจางด้วย 0.1% อัลบูมิน (w/v) ที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:4 เพื่อให้ได้ผลบวกที่เกรดของ agglutination เท่ากับ 2+ - 3+

3.2.2 ดูลักษณะทางกายภาพของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร จากข้อ 3.2.1 ทางด้านสี ความใสและความขุ่นด้วย ตาเปล่า วัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm จำนวน 30 ครั้ง และ ค่า specific gravity (Sp.gr.) จำนวน 30 ครั้ง

3.2.3 ทำการทดสอบ antibody screening โดยวิธีหลอดทดลองโดยใช้ซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร จากข้อ 3.2.1 จำนวน 30 ครั้ง และตรวจสอบผลการทดลองว่าให้ผลเป็นบวกที่สถานะของการทดสอบที่ antiglobulin phase เท่านั้น

3.3 การตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธีหลอดทดลอง

3.3.1 การทดสอบ antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค

เตรียมสารละลายซีรัมเสมือนจริง 2 หยด ลงในแต่ละหลอดทดลอง จำนวน 3 หลอด เตรียม screening cells O1, O2 และ O3 ลงในหลอดที่ 1, 2 และ 3 หลอดทดลองละ 1 หยด ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) บันทึกผลที่อุณหภูมิห้อง (RT) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย normal saline solution (NSS) จำนวน 3 ครั้ง โดยใส่น้ำเกลือประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง ครั่งสุดท้ายสลัดน้ำเกลือทิ้งจนหมด และซับน้ำส่วนที่เหลือให้แห้ง เตรียมน้ำยา anti-human globulin 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า ถ้าไม่พบปฏิกิริยาให้อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลที่ indirect antiglobulin test (IAT) ตามวิธีการของ Roback และคณะ [1]

3.3.1 การทดสอบ antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ

เตรียมสารละลายซีรัมเสมือนจริง 2 หยด ลงในแต่ละหลอดทดลอง จำนวน 3 หลอด เตรียมน้ำยาน้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ หลอดทดลองละ 2 หยด เตรียม screening cells O1, O2 และ O3 ลงในหลอดที่ 1, 2 และ 3 หลอดทดลองละ 1 หยด ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย NSS จำนวน 3 ครั้ง โดยใส่น้ำเกลือประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง ครั่งสุดท้ายสลัดน้ำเกลือทิ้งจนหมด และซับน้ำส่วนที่เหลือให้แห้ง เตรียมน้ำยา anti-human globulin 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า ถ้าไม่พบปฏิกิริยาให้อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลที่ IAT ตามวิธีการของ Roback และคณะ [1]

3.3.2 การทดสอบ antibody screening ในตัวกลางเอนไซม์ปาเปน

เตรียมสารละลายซีรัมเสมือนจริง 2 หยด ลงในแต่ละหลอดทดลอง จำนวน 2 หลอด เตรียม papainized screening cells O1 และ O2 ลงในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดทดลองละ 1 หยด ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง บันทึกผลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย NSS 3

ครั้ง โดยใส่น้ำเกลือประมาณ 3/4 ของหลอดทดลอง ครั้งสุดท้ายสลัดน้ำเกลือทิ้งจนหมด และซับน้ำส่วนที่เหลือให้แห้ง เติมน้ำยา anti-human globulin 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่น 20 วินาที เพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า ถ้าไม่พบปฏิกิริยาให้อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลที่ IAT ตามวิธีการของ Roback และคณะ [1]

การควบคุมคุณภาพ antiglobulin test โดยการเติม 3% Coombs' Control Cells 1 หยด ลงในหลอดทดลองที่อ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็นลบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปั่น 20 วินาที ถ้าให้ผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็นบวกแสดงว่าการทดสอบถูกต้องและน้ำยามีประสิทธิภาพ สามารถแปลผลการทดลองได้ ถ้าให้ผลเป็นลบแสดงว่าการทดสอบไม่ถูกต้องหรือน้ำยาไม่มีประสิทธิภาพ ไม่สามารถแปลผลการทดลองได้ ต้องทำการทดสอบใหม่ตามวิธีการของ Roback และคณะ [1]

3.3.3 การอ่านผลการทดสอบ

การอ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง ลงผลการทดสอบ ดังนี้

H หมายถึง complete hemolysis คือ มีการแตกสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด น้ำเป็นสีแดง และไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ก้นหลอดทดลอง

PH หมายถึง partial hemolysis คือ มีการแตกสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดงบางส่วน น้ำเป็นสีแดง และมีเซลล์เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเหลืออยู่ก้นหลอดทดลอง

0 หมายถึง ไม่มีการแตกสลายของเซลล์เม็ดเลือดแดง

การอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ลงผลการทดสอบ ดังนี้

4+ หมายถึง เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส

3+ หมายถึง เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดใหญ่หลายก้อน น้ำใส

2+ หมายถึง เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส

1+ หมายถึง เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กหลายก้อน น้ำขุ่นและมีสีแดง

w หมายถึง เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กมาก ๆ มองด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็น

การกลุ่ม เห็นได้ชัดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำขุ่นและมีสีแดง

0 หมายถึง ไม่มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

3.4 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

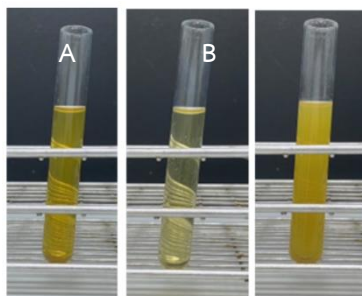
รายงานลักษณะทางกายภาพของซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม, สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน และสูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น ที่ไม่เติม anti-D (IgG) และเติม anti-D (IgG) ทางด้านสี ความใสและความขุ่น

เก็บรวบรวมผลการศึกษาและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 25.0 การรายงานข้อมูลของค่า OD และ ค่า Sp.Gr. ในรูปแบบของ median (range) การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่า OD และ ค่า Sp.Gr. ที่ได้จากซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร ใช้สถิติทดสอบ คือ Kruskal-Wallis test ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

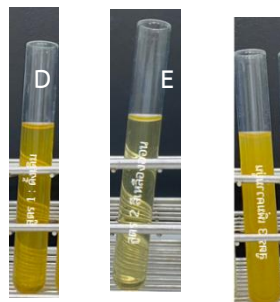
การวิเคราะห์ผลการทดสอบ antibody screening ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค, น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ papain โดยใช้ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติมและเติม anti-D (IgG) รายงานในรูปแบบร้อยละของการพบผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative) ตามลำดับ

4. ผลการวิจัย

ซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม, สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน และสูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น ที่ไม่เติม anti-D (IgG) และ เติม anti-D (IgG) เพื่อให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นลบในทุกตัวกลางและทุกสถานะของการทดสอบ และเป็นบวกทุกตัวกลางที่สถานะ antiglobulin phase เท่านั้น ตามลำดับ เมื่อดูด้วยตาเปล่า มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1 ลักษณะของซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม (A), สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน (B) และสูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น (C) ที่ไม่เติม anti-D (IgG)



ภาพที่ 2 ลักษณะของซีรัมเสมือนจริงสูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม (D), สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน (E) และสูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น (F) ที่เติม anti-D (IgG)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่า OD และ Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร ที่ไม่เติม anti-D (IgG)

	สูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม	สูตรที่ 1 สีเหลืองอ่อน	สูตรที่ 1 สีเหลืองขุ่น	ค่า p
OD (median)	2.10	0.55	2.94	0.00
(min, max))	(2.10, 2.10)	(0.55, 0.55)	(2.94, 2.94)	
Sp.Gr. (median)	1.035	1.020	1.035	0.00
(min, max)	(1.035, 1.035)	(1.020, 1.020)	(1.035, 1.035)	

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่า OD และ Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร ที่เติม anti-D (IgG)

	สูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม	สูตรที่ 1 สีเหลืองอ่อน	สูตรที่ 1 สีเหลืองขุ่น	ค่า p
OD (median)	1.74	0.44	2.60	0.00
(min, max))	(1.74, 1.74)	(0.44, 0.44)	(2.60, 2.60)	
Sp.Gr. (median)	1.034	1.020	1.034	0.00
(min, max)	(1.034, 1.034)	(1.020, 1.020)	(1.034, 1.034)	

ตารางที่ 3 ผลของค่า p จากการเปรียบเทียบค่า OD และ Sp.Gr. ของการจับคู่ซีรัมเสมือนจริงในแต่ละสูตร ที่ไม่เติมและเติม anti-D (IgG)

คู่ที่	การจับคู่	OD		Sp.Gr.	
		ไม่เติม anti-D (IgG)	เติม anti-D (IgG)	ไม่เติม anti-D (IgG)	เติม anti-D (IgG)
1	สูตรที่ 1 - สูตรที่ 2	0.00	0.00	0.00	0.00
2	สูตรที่ 1 - สูตรที่ 3	0.00	0.00	1.00	1.00
3	สูตรที่ 2 - สูตรที่ 3	0.00	0.00	0.00	0.00

ผลการเปรียบเทียบค่า OD และ Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร ที่ไม่เติม anti-D (IgG) และเติม anti-D (IgG) พบว่า ได้ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีอย่างน้อย 1 คู่ ที่มีค่า OD และ Sp.Gr. แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2) โดยค่า OD ของทุกคู่ มีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับค่า Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงคู่ที่ 1 คือ สูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม - สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน และ ซีรัมเสมือนจริงคู่ที่ 3 คือ สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน - สูตรที่ 2 สีเหลืองขุ่น มีค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนซีรัมเสมือนจริงคู่ที่ 2 คือ สูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิม - สูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3) แสดงว่าเมื่อผู้วิจัยดูลักษณะของซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร ด้วยตาเปล่า ทางด้านสี ความใสและความขุ่น พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับค่า OD ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่า Sp.Gr. พบว่า เมื่อมีการเจือจางซีรัมเสมือนจริงด้วย 0.1% อัลบูมิน (w/v) เพื่อทำซีรัมเสมือนจริง สูตรที่ 2 สีเหลืองอ่อน จะทำให้ค่า Sp.Gr. มีค่าที่ต่ำกว่าและแตกต่างกับสูตรที่ 1 สีเหลืองดั้งเดิมและสูตรที่ 3 สีเหลืองขุ่น เนื่องจากอนุภาคที่อยู่ในสารละลายถูกเจือจาง

ตารางที่ 4 ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เต็ม anti-D (IgG) และเต็ม anti-D (IgG) ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค

ซีรัมเสมือนจริง	O1				O2				O3			
	RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC
ไม่เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	0	0	0	1+	0	0	0	1+	0	0	0	1+
เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	0	0	2+	ND	0	0	2+	ND	0	0	2+	ND

ND = Not done

ตารางที่ 5 ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เต็ม anti-D (IgG) และเต็ม anti-D (IgG) ในตัวกลางน้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ

ซีรัมเสมือนจริง	O1				O2				O3			
	RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC
ไม่เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	0	0	0	1+	0	0	0	1+	0	0	0	1+
เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	0	0	2+	ND	0	0	2+	ND	0	0	2+	ND

ND = Not done

ตารางที่ 6 ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เต็ม anti-D (IgG) และเต็ม anti-D (IgG) ในตัวกลางในตัวกลางเอนไซม์ปาเปน

ซีรัมเสมือนจริง	O1				O2			
	RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC
ไม่เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	0	0	0	1+	0	0	0	1+
เต็มanti-D (IgG) (n = 30)	3+	3+	3+	ND	3+	3+	3+	ND

ND = Not done

ผลการตรวจกรองแอนติบอดี ในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ พบว่า ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เต็ม anti-D (IgG) ให้ผลลบทุกสถานะของการทดสอบ ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เต็ม anti-D (IgG) ให้ผลบวก (2+) ที่สถานะ IAT (indirect antiglobulin test) เท่านั้น (ตารางที่ 4 และตารางที่ 5) ในขณะที่ผลการ

ตรวจกรองแอนติบอดี ในตัวกลางเอนไซม์ปาเปน พบว่า ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) ให้ผลลบทุกสถานะของการทดสอบ ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลบวก (3+) ทุกสถานะของการทดสอบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจกรองแอนติบอดีของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) และ anti-D (IgG) ในตัวกลางน้ำเกลือปกติ, น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และ เอนไซม์ปาเปน

ซีรัมเสมือนจริง	ผลลบ	ผลบวก
ไม่เติม anti-D (IgG) (n = 30)	30 (100%)	0 (100%)
เติม anti-D (IgG) (n = 30)	0 (100)	30 (100%)

ผลการทดสอบ antibody screening ของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) และ anti-D (IgG) ทั้งในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ปาเปน พบว่า ให้ผลการทดสอบเป็นลบจริง ร้อยละ 100 และให้ผลการทดสอบเป็นบวกจริง ร้อยละ 100 คือไม่เกิดผล false positive และ false negative ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

5. อภิปรายผลและข้อเสนอแนะการวิจัย

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้พัฒนาการเตรียมซีรัมเสมือนจริง เพื่อให้ได้ซีรัมเสมือนจริงที่มี สีเหลือง สีเหลืองอ่อน และสีเหลืองขุ่น เหมือนกับสีของซีรัมจริงที่ได้จากเลือดของมนุษย์ ที่มีความแตกต่างกันได้ในแต่ละคน ผลจากการศึกษานี้พบว่าสามารถนำซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 สูตร มาใช้ในการเรียนการสอน เรื่อง antibody screening ของภาคปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การบริการโลหิตได้

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจกรองแอนติบอดี ควรเป็นวิธีที่ตรวจหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ โดยตรวจพบแอนติบอดีที่ไม่มีความสำคัญทางคลินิกได้น้อย และเป็นวิธีไม่ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจไม่นาน การศึกษานี้ผู้วิจัยใช้เทคนิคในตัวกลางน้ำเกลือไอโซโทนิค ซึ่งเป็นวิธีที่ทำงานที่สุด ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก แต่วิธีนี้ขาดความไว จึงเพิ่มเทคนิคในตัวกลางน้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ โดยน้ำยานี้จะช่วยลดแรงของไอออนในปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ทำให้แอนติบอดีจับกับแอนติเจนได้เร็วขึ้น และลดระยะเวลาในการบ่ม ทำให้การตรวจกรองแอนติบอดีมีความรวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น [7] สำหรับเทคนิคเอนไซม์ปาเปน จะลดประจุลบที่ผิวเม็ดเลือดแดง โดยย่อยโพลีเปปไทด์ ตรังโมเลกุลของ sialic acid ซึ่งมีประจุลบ เมื่อประจุลบลดลง แรงผลักระหว่างเม็ดเลือดแดงก็จะน้อยลง ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์แคบลง แอนติบอดีที่เป็น IgG สามารถจับกับเม็ดเลือดแดงได้มากกว่า 1 เซลล์ จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้โดยไม่ต้องทำ indirect antiglobulin test [8] การศึกษานี้ได้ใช้ 3% O1 cells, O2 cells, O3 cells (screening cells), 3% papainized screening cells (O1, O2), น้ำยาน้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เนื่องจากมีราคาไม่แพง และสะดวกในการใช้งาน

การติดตามดูผลการตรวจกรองแอนติบอดีโดยใช้ซีรัมเสมือนจริง 3 แบบ ของการศึกษานี้ในทุกตัวกลางของการทดสอบ ได้แก่ น้ำเกลือไอโซโทนิค น้ำเกลือความเข้มข้นไอออนต่ำ และเอนไซม์ปาเปน พบว่าซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) ให้ผลการทดสอบที่ไม่พบเม็ดเลือดแดงแตก และให้ผลเป็นลบจริงทุกสถานะของการทดสอบ

โดยไม่เกิดผลบวกปลอม (false positive) และซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลการทดสอบที่ไม่พบเม็ดเลือดแดงแตก และให้ผลเป็นบวกที่สถานะ antiglobulin phase เท่านั้น โดยไม่เกิดผลลบปลอม (false negative)

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบซีรัมเสมือนจริงทั้ง 3 แบบ ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกสำหรับการตรวจกรองแอนติบอดี โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ความถ่วงจำเพาะ และการตรวจกรองแอนติบอดี จำนวนอย่างละ 30 ครั้ง ซึ่งการใช้ขนาดตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 30 การกระจายของการสุ่มตัวอย่างจะเป็นไปตามการกระจายแบบปกติโดยประมาณ ขนาดตัวอย่าง 30 จึงมีขนาดใหญ่เพียงพอ [9]

ผลลัพธ์จากงานวิจัยนี้แสดงว่าซีรัมเสมือนจริงนี้สามารถเป็นสิ่งตัวอย่างเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการของวิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ได้เป็นอย่างดี

ข้อเสนอแนะจากการทำวิจัยและแนวทางในการทำวิจัยต่อไป 1) ใช้น้ำยาแอนติบอดีต่อหมู่เลือด ที่เป็น IgM เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการได้ 2) ศึกษาการใช้ซีรัมเสมือนจริงเพื่อเป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อทดสอบว่าการทดสอบ antibody screening ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ได้ผลการทดสอบตรงตามที่คาดหวังไว้หรือไม่ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Roback, J.D., Combs, M.R., Grossman, B.J., & Hillyer, C.D. (2008). Identification of antibodies to red cell antigens. In Technical Manual (16th ed). American Association of Blood Banks. 465-498.
- [2] Kim, H.J., Ko, DH. Transfusion-transmitted infections. Blood Res. 59, 14 (2024).
<https://doi.org/10.1007/s44313-024-00014-w>
- [3] Yothinarak, A., & Prommano, O. (2017). Preliminary study of preparation of virtual serum for unexpected antibody screening. In Silalai, N. (ed), Science and technology as a key driver towards Thailand 4.0. The 5th academic science and technology conference (pp.HS-870-877).
- [4] Yothinarak, A. (2018). Virtual serum preparation for unexpected antibody screening. In Homvisasevongsa, S. (ed), Science, technology and innovation: following the wisdom of the king for sustainable national development. The 6th academic science and technology conference (pp.HS-172-179).
- [5] Yothinarak, A., & Gatedee, J. (2025). Development of virtual serum for antibody screening on the laboratory teaching in the transfusion science subject. SciTech Research Journal, 8(1), 121-136.
- [6] Yimklib, W. (2023). Research competency: routine to research (R2R). Lawarath Social E-Journal, 5(1), 175-191.
- [6] Walker, L. (2018). Low-ionic-strength saline solution-antiglobulin test (LISS-AGT). Immunohematology, 34(2), 57-60.

- [8] Saipin, J. (2003). Blood group antibody detection technique. J Hematol Transfus Med, 13 (3), 225-232.
- [9] Turney, S. (2023, June 22). Central limit theorem/ formuladefinition & examples.
<https://www.scribbr.com/statistics/central-limit-theorem>