



Development of Virtual Serum for Antibody Screening on the Laboratory Teaching in the Transfusion Science Subject

¹*Aungsana Yothinarak & ¹Jiraporn Gatedee

¹Faculty of Medical Technology, Rangsit University

*Corresponding author: aungsana.y@rsu.ac.th

Received	Reviewed	Revised	Accepted
03/03/2025	29/03/2025	19/04/2025	21/04/2024

Abstract

Objective: To prepare a virtual serum that has a yellow and light yellow color similar to the color of serum obtained from human blood for use in antibody screening that gives negative and positive results by the conventional tube test (CTT) and the column agglutination technique (CAT).

Methods: Virtual serum from previous study was prepared by reducing the amount of albumin to 0.1 g/dL without and with added anti-D (IgG). The virtual serum was diluted to dilution ratios of 1:2, 1:4, and 1:8. The naked eyes reviewed the appearance of the virtual serum. Optical density and specific gravity were measured and compared between dilution ratios using the Kruskal-Wallis test statistics. Antibody screening was performed using CTT and CAT.

Results: Virtual serum with different dilution ratios was viewed with the naked eye, which gave different shades of yellow and light yellow. The optical density and specific gravity were statistically significant different ($p < 0.05$). The results of the antibody screening without and with added anti-D (IgG) at every dilution accurate ratio showed accurate negative results with no false positives and authentic positive results with no false negatives.

Conclusion: Virtual serum prepared by reducing the amount of albumin to 0.1 g/dL with varying ratios of dilution had a distinct yellow appearance. Antibody screening using CTT and CAT that are truly negative and positive results without false positives and false negatives, respectively.

Keywords: Virtual Serum; Antibody screening; Albumin; Yellow



การพัฒนาซีรัมเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรองแอนติบอดีเพื่อใช้ในการเรียน การสอนภาคปฏิบัติการวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต

¹*อังสนา โยธินารักษ์ และ¹ จิราภรณ์ เกตุดี

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

*ผู้นิพนธ์หลัก: aungsana.y@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองและสีเหลืองอ่อนเหมือนกับซีรัมจริงที่ได้จากเลือดของมนุษย์ เพื่อใช้ในการทดสอบ antibody screening ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวก โดยวิธี conventional tube test (CTT) และ column agglutination technology (CAT).

การทดลอง ทำการเตรียมซีรัมเสมือนจริงจากงานวิจัยก่อนหน้า โดยการลดปริมาณของอัลบูมินเป็น 0.1 กรัม/เดซิลิตร และไม่เติมและเติม anti-D (IgG) จากนั้นทำการเจือจางซีรัมเสมือนจริงให้มีอัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1:2, 1:4 และ 1:8 ตรวจลักษณะของซีรัมเสมือนจริงด้วยตาเปล่า วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงและความถ่วงจำเพาะ โดยใช้สถิติทดสอบ Kruskal - Wallis test ทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT

ผลการทดลอง ซีรัมเสมือนจริงที่มีอัตราส่วนการเจือจางที่ต่างกัน เมื่อดูด้วยตาเปล่าให้สีเหลืองและสีเหลืองอ่อนที่ต่างกัน และมีค่าการดูดกลืนแสง ความถ่วงจำเพาะ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการทดสอบ antibody screening พบว่าซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) ทุกอัตราส่วนการเจือจาง ให้ผลการทดสอบเป็นลบจริงและไม่เกิดผลบวกปลอม ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ทุกอัตราส่วนการเจือจาง ให้ผลการทดสอบเป็นบวกจริงและไม่เกิดผลลบปลอม

สรุปผลการทดลอง ซีรัมเสมือนจริงที่เตรียมโดยการลดปริมาณอัลบูมิน และมีอัตราส่วนการเจือจางที่ต่างกัน ให้ลักษณะสีเหลืองที่ต่างกัน และให้ผลการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT ที่ขึ้นผลลบและผลบวกได้จริง โดยไม่เกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอม

คำสำคัญ: ซีรัมเสมือนจริง; การตรวจกรองแอนติบอดี; อัลบูมิน; สีเหลือง



บทนำ

การเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยรังสิต มีหัวข้อเรื่อง antibody screening ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อตรวจกรองหา unexpected antibody ที่มีความสำคัญทางด้านคลินิก โดยทำในกลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ ผู้บริจาคโลหิต ผู้ป่วยที่จะรับเลือด ผู้ป่วยที่เกิดปฏิกิริยาอันไม่พึงประสงค์จากการรับเลือด หญิงมีครรภ์ที่มีประวัติว่าเคยมีบุตรตาเหลือง ตัวเหลือง มีประวัติการแท้ง หรือได้รับเลือดมาก่อนตั้งครรภ์แล้วหลายครั้ง การทดสอบดังกล่าวต้องมีการใช้สิ่งตัวอย่างชนิดซีรัม ซึ่งการเตรียมสิ่งตัวอย่างชนิดซีรัมเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เลือดครบส่วนปริมาณมากเพื่อนำมาปั่นแยกซีรัมออกมา จึงจะเพียงพอต่อนักศึกษาชั้นปีที่ 3 จำนวน 180 คน ทั้งนี้การเจาะเลือดจากมนุษย์ในปริมาณมากนั้น ไม่สามารถทำได้เพราะอาจเป็นอันตรายต่อผู้ถูกเจาะ นอกจากนี้ unexpected antibody ในบางกลุ่มประชากรพบได้น้อย โดยมีการพบได้ร้อยละ 0.3 - 38.0 การพบร้อยละที่แตกต่างกันนั้นขึ้นกับกลุ่มประชากรและวิธีการทดสอบที่ใช้ (Roback et al., 2008) และซีรัมยังเป็นสิ่งตัวอย่างที่อาจเสี่ยงต่อโรคติดต่อจากการรับเลือด เช่น เชื้อตับอักเสบบี ซีและเชื้อเอชวี (HBV, HCV, HIV) (Kim & Ko, 2024) ซึ่งมีอันตรายต่อนักศึกษาที่ทำการฝึกตรวจ antibody screening

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจเรื่อง Routine to Research (R2R) ซึ่งเป็นการนำเอาปัญหาที่พบในงานประจำวันมาเข้าสู่งานวิจัยเพื่อหาแนวทางแก้ไขและนำไปพัฒนางานประจำให้ดีขึ้น โดยต้องมีการวางแผนและการดำเนินงานวิจัยที่ถูกต้องตามหลักวิชาการเพื่อให้ได้คำตอบที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด (Yimklib, 2023) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการเตรียมซีรัมเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibody โดยใช้เทคนิคทดสอบในตัวกลางที่เป็นน้ำเกลือปกติ (saline test)

ปี 2560 อังสนา โยธินารักษ์ และคณะ ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเตรียมซีรัมเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibody เพื่อใช้ในการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยเป็นการเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่มีวิธีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน หาซื้อสารและน้ำยา unexpected antibody ได้ง่าย ราคาไม่แพง และนำมาทำเป็นสิ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบและผลบวกในการทดสอบ antibody screening ในตัวกลางที่เป็น normal saline solution (saline test) (Yothinarak & Prommano, 2017) ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ผู้สอนมีทางเลือกที่จะเตรียมซีรัมเสมือนจริงเพื่อทดแทนการใช้ pooled serum หรือ frozen plasma ที่ได้จากมนุษย์ ซึ่งมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อจากเลือดของมนุษย์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้พบปัญหาบางอย่างในการทดสอบ antibody screening คือซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลลบบางส่วนทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาในปี 2561 อังสนา โยธินารักษ์ ได้พัฒนาการเตรียมซีรัมเสมือนจริงโดยเพิ่มการเติมอัลบูมิน โดยนำมาทำเป็นสิ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบและผลบวกในการทดสอบ antibody screening ในตัวกลางที่เป็น normal saline solution (NSS), low



ionic strength saline solution (LISS) และ papain enzyme ผลการทดลองพบว่าซีรัมเสมือนจริงไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในตัวกลางทั้งสามในทุกขั้นตอนของการทดสอบ (Yothinarak, 2018)

จากงานวิจัยเรื่องการเตรียมซีรัมเสมือนจริง ดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะลดจำนวนของสารอัลบูมินซึ่งมีราคาแพง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย และถ้ามีการเจือจางซีรัมเสมือนจริงเพื่อให้ได้ซีของซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองปกติจนถึงสีเหลืองอ่อน เพื่อนำมาใช้ทำสิ่งตัวอย่างได้หลาย unknown ที่มีความเข้มข้นของสีเหลืองที่แตกต่างกัน จะเป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอนในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต นอกจากนี้นักวิจัยยังได้ทำการทดสอบ antibody screening โดยวิธี conventional tube test (CTT) และ column agglutination technology (CAT) ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ซึ่งพบว่าวิธี CAT มีความไว ความแม่นยำทำได้ง่าย ไม่ต้องล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงในการทำ indirect antiglobulin test ทำให้ลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจากสิ่งตัวอย่าง (Lapierre et al., 1990) สำหรับการทดสอบ antibody screening มีผู้ศึกษาพบว่า วิธี CAT มีความไวกว่าวิธี CTT ในการตรวจกรองและการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีเมื่อใช้เอนไซม์ และ IAT โดยเฉพาะ anti-Le^a, anti-M และ anti-E แต่วิธี CAT มีความไวน้อยกว่าในการตรวจแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง anti-P₁ (Na Thalung, 1993)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยในการนำซีรัมเสมือนจริงมาใช้ทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CAT งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ลดปริมาณของอัลบูมิน เจือจางให้มีสีเหลืองอ่อน และศึกษาการพบผลบวกปลอมและผลลบปลอมในการทดสอบ antibody screening ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นแนวทางในการเตรียมซีรัมเสมือนจริงเพื่อใช้ในการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

วิธีการวิจัย

การเตรียมซีรัมเสมือนจริงสำหรับการทดสอบ antibody screening

1. ซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองปกติ

ชั่งผงแก๊กฮวย 6 กรัม, NaCl 0.85 กรัม, อัลบูมิน 0.1 กรัม ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเข้ากัน เติมน้ำผสมอาหารสีเหลืองไข่ 150 ไมโครลิตร ผสมจนสารละลายละลายเข้ากัน สารละลายที่เตรียมนี้ คือซีรัมเสมือนจริงสำหรับการทดสอบ antibody screening ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบทุกสถานะของการทดสอบ สำหรับซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกสำหรับการทดสอบ antibody screening ทำโดยเจือจาง anti-D (IgG) ด้วยซีรัมเสมือนจริง แบบ serial two fold dilution ให้ได้อัตราส่วนความเจือจาง 1:2 - 1:8 เพื่อให้ได้ผลบวกที่เกรด 2+ จนถึงเกรด 3+ นำซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกสำหรับการทดสอบ antibody



screening ไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm จำนวน 30 ครั้ง และ ค่า specific gravity (Sp.Gr.) จำนวน 30 ครั้ง

2. ซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อน

ซึ่งผงแก๊ส 6 กรัม, NaCl 0.85 กรัม, อัลบูมิน 0.1 กรัม ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเข้ากัน เติมน้ำผสมอาหารสีเหลืองไข่ 150 ไมโครลิตร ผสมจนสารละลายละลายเข้ากัน จากนั้นเจือจางด้วย NSS ที่เติมอัลบูมิน 0.1 กรัม% (ซึ่ง NaCl 0.85 กรัม และ อัลบูมิน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ให้เป็น 1:2, 1:4 และ 1:8 สารละลายที่เตรียมนี้ คือ ซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อนสำหรับการทดสอบ antibody screening ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบทุกสถานะของการทดสอบ สำหรับซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อนที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกสำหรับการทดสอบ antibody screening ทำโดยเจือจาง anti-D (IgG) ด้วยซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อน แบบ serial two fold dilution ให้ได้อัตราส่วนความเจือจาง 1:2 - 1:8 เพื่อให้ได้ผลบวกที่ เกรด 2+ จนถึง เกรด 3+ นำซีรัมเสมือนจริงสีเหลืองอ่อนที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกสำหรับการทดสอบ antibody screening ไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm จำนวน 30 ครั้ง และ ค่า specific gravity (Sp.Gr.) จำนวน 30 ครั้ง

3. การทดสอบ antibody screening

การทดสอบ antibody screening จะใช้ซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวก โดยวิธี CTT และ CAT วิธีละ 30 ครั้ง เพื่อศึกษาผลการทดสอบว่าเกิดผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative) หรือไม่ ถ้าการอ่านผลที่สถานะอุณหภูมิห้อง และ/หรือ 37 องศาเซลเซียส พบ hemolysis จะเตรียมซีรัมเสมือนจริงใหม่ โดยเพิ่มอัลบูมินเป็น 0.2 กรัม%

3.1 การทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี conventional tube test (CTT)

เตรียมหลอดทดลองขนาด 10x75 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลอด เขียนกำกับหลอด O1 และ O2 หยดซีรัมเสมือนจริง 2 หยด เติม 3% screening cells (แอนติเจนของ screening cells มีแอนติเจนของหมู่เลือดที่สำคัญ ได้แก่ แอนติเจน DCEce, MN, Mi^a, Ss, P₁, Le^a, Le^b, Kk, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b และ Di^a) ได้แก่ 3% O1 และ 3% O2 1 หยด ให้ตรงกับที่เขียนกำกับไว้ข้างหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ปั่นอ่านผล 20 วินาที โดยดูปฏิกิริยา hemolysis ถ้าไม่พบ hemolysis ให้เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยา agglutination บันทึกผลที่อุณหภูมิห้อง (RT) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นอ่านผล 20 วินาที โดยดูปฏิกิริยา hemolysis ถ้าไม่พบ hemolysis ให้เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยา agglutination บันทึกผลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย NSS จำนวน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายสไลด์ NSS ออกจนหมด หยด antihuman globulin reagent 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่นอ่านผล 20 วินาที เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยา agglutination ด้วยตา



เปล่า ถ้าไม่พบปฏิกิริยา agglutination ให้ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลที่ indirect antiglobulin test (IAT)

การควบคุมคุณภาพของ antiglobulin test: หยด Coombs' Control Cells (CCC) 1 หยดลงในหลอดที่ให้ผลของการทดสอบเป็นลบ ปั่นอ่านผลอีกครั้ง ถ้าให้ผลบวกคือมีปฏิกิริยา agglutination แสดงว่าขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงถูกต้อง น้ำยา antihuman globulin มีคุณภาพดี ออกผลการทดสอบที่ IAT ว่า เป็นลบจริง แต่ถ้าให้ผลลบคือ ไม่มีปฏิกิริยา agglutination แสดงว่าขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ถูกต้อง หรือน้ำยา antihuman globulin ไม่มีคุณภาพ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้น

การอ่านผลปฏิกิริยา hemolysis มีรายละเอียด ดังนี้

- | | |
|----|---|
| PH | มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงบางส่วน (partial hemolysis) น้ำเป็นสี
แดง มีเซลล์เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ที่ก้นหลอดทดลอง |
| H | มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (complete hemolysis)
น้ำเป็นสีแดง ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ที่ก้นหลอดทดลอง |

การอ่านผลปฏิกิริยา agglutination มีรายละเอียด ดังนี้

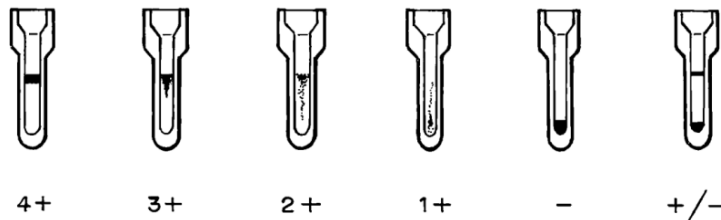
- | | |
|----|--|
| 4+ | เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส |
| 3+ | เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส |
| 2+ | เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส |
| 1+ | เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กหลายก้อน น้ำขุ่นและมีสีแดง |
| w | เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็นการจับ
กลุ่มของเม็ดเลือดแดง จะเห็นได้ชัดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำขุ่นและ
มี
สีแดง |
| 0 | ไม่พบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง น้ำขุ่นเป็นเนื้อเดียวกันและมีสีแดง |

3.2 การทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี column agglutination technology (CAT)

เติม 1% screening cells ได้แก่ 1% O1 และ 1% O2 50 µl ลงใน microcolumn AHG polyspecific เติมซีรัมเสมือนจริงลงในแต่ละ microcolumn หลอดละ 25 µl อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที ปั่นนาน 5 นาที อ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

ระดับความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่มในวิธี CAT สามารถอ่านผลได้เป็น 4+, 3+, 2+, 1+, - และ +/- ดังแสดงในรูปที่ 1



+ = agglutination, - = no agglutination, +/- = mixed field agglutination

Figure 1 Grading of agglutination reactions performed in gel

(ที่มา: Na Thalang, 1993)

การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บรวบรวมผลการศึกษาและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 25.0 การรายงานข้อมูลของค่า optical density (OD) และ ค่า specific gravity (Sp.Gr.) ในรูปของ median (range)

การวิเคราะห์การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า OD และ Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงที่อัตราส่วนการเจือจางที่ต่างกัน ใช้สถิติทดสอบ Kruskal – Wallis test ค่า $p < 0.050$ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) เพื่อให้ผลการทดสอบ antibody screening โดยวิธี CTT และ CAT เป็นลบทุกสถานะของการทดสอบ ที่ไม่เจือจางและเจือจาง มีลักษณะสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 2 ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) เพื่อให้ผลการทดสอบ antibody screening โดยวิธี CTT และ CAT เป็นบวกที่สถานะ antiglobulin phase ที่ไม่เจือจางและเจือจาง มีลักษณะสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 3

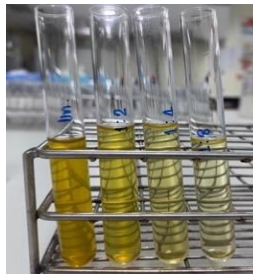


Figure 2 The appearance of the virtual serum without anti-D (IgG)



Figure 3 The appearance of the virtual serum with anti-D (IgG)

Table 1 Comparison of OD and Sp.Gr. values of virtual serum without anti-D (IgG) and with anti-D (IgG) at different dilution ratios

ซีรัมเสมือนจริง	อัตราส่วนการเจือจาง	OD median (min, max)	p	Sp.Gr. median (min, max)	p
ซีรัมเสมือนจริง	undiluted	1.849 (1.831, 1.862)	0.000	1.028 (1.027, 1.028)	0.000
ไม่เติม anti-D (IgG)	1:2	0.947 (0.938, 0.956)		1.017 (1.016, 1.017)	
	1:4	0.475 (0.471, 0.483)		1.011 (1.011, 1.011)	
	1:8	0.239 (0.236, 0.242)		1.008 (1.008, 1.008)	
ซีรัมเสมือนจริง	1:2	1.002 (0.956, 1.123)	0.000	1.022 (1.022, 1.024)	0.000
เติม anti-D (IgG)	1:4	0.463 (0.442, 0.465)		1.015 (1.014, 1.016)	
	1:8	0.235 (0.232, 0.239)		1.010 (1.010, 1.010)	

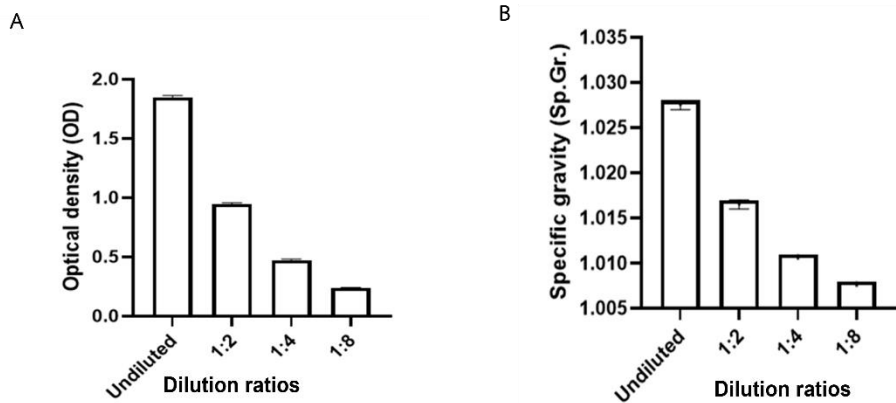


Figure 4 (A) Optical density values and (B) specific gravity values of virtual serum without anti-D (IgG) at different dilution ratios

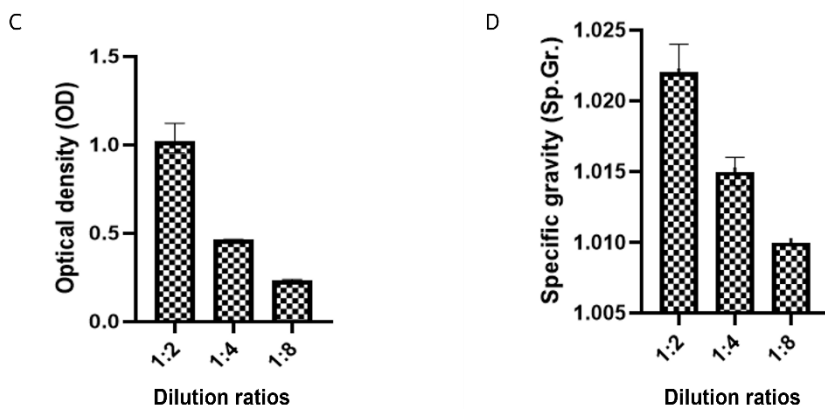


Figure 5 (C) Optical density values and (D) specific gravity values of virtual serum with anti-D (IgG) at different dilution ratios

**Table 2** Comparison of OD and Sp.Gr. values of each dilution ratio of virtual serum without anti-D (IgG) and with anti-D (IgG)

ซีรัมเสมือนจริง	คู่ที่	การจับคู่ของอัตราส่วนการเจือจาง	OD	Sp.Gr.
			ค่า p	ค่า p
ไม่เติม anti-D (IgG)	1	undiluted - 1:2	0.000	0.004
	2	undiluted - 1:4	0.000	0.000
	3	undiluted - 1:8	0.000	0.000
	4	1:2 - 1:4	0.005	0.004
	5	1:2 - 1:8	0.000	0.000
	6	1:4 - 1:8	0.005	0.004
เติม anti-D (IgG)	1	1:2 - 1:4	0.000	0.000
	2	1:2 - 1:8	0.000	0.000
	3	1:4 : 1:8	0.000	0.000

ผลการเปรียบเทียบค่า OD และ Sp.Gr. ของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่มีการเติม anti-D (IgG) ที่อัตราส่วนการเจือจางที่ต่างกัน และซีรัมเสมือนจริงที่มีการเติม anti-D (IgG) ที่อัตราส่วนการเจือจางที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1, รูปที่ 4 และรูปที่ 5 พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ค่า $p = 0.000$ แสดงว่ามีค่า OD และ Sp.Gr. อย่างน้อย 1 คู่ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าอัตราส่วนการเจือจางของซีรัมเสมือนจริงทุกคู่ มีค่า OD และ Sp.Gr. ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงว่าเมื่อผู้วิจัยเห็นด้วยตาเปล่าในแต่ละคู่ให้สีเหลือง และสีเหลืองอ่อนที่ต่างกัน เมื่อนำมาวัดค่า OD และ Sp.Gr. พบว่ามีค่าที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอัตราส่วนการเจือจางน้อยจะให้ค่า OD และ Sp.Gr. มากกว่าอัตราส่วนการเจือจางมาก

**Table 3** Results of antibody screening of virtual serum without anti-D (IgG) and with anti-D (IgG) at different dilution ratios by CTT

ซีรัมเสมือนจริง	อัตราส่วนการเจือจาง	O1				O2			
		RT	37°C	IAT	CCC	RT	37°C	IAT	CCC
ไม่เติม anti-D (IgG) (n = 30)	undiluted	0	0	0	1+	0	0	0	1+
	1:2	0	0	0	1+	0	0	0	1+
	1:4	0	0	0	1+	0	0	0	1+
	1:8	0	0	0	1+	0	0	0	1+
เติม anti-D (IgG) (n = 30)	1:2	0	0	3+	ND	0	0	3+	ND
	1:4	0	0	3+	ND	0	0	3+	ND
	1:8	0	0	3+	ND	0	0	3+	ND

ND = Not done

**Figure 6** Positive results of antibody screening of virtual serum with anti-D (IgG) by CTT

ผลการทดสอบ antibody screening ของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) และเติม anti-D (IgG) ทุกอัตราส่วนการเจือจาง ด้วยวิธี CTT ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) ให้ผลลบทุกสถานะของการทดสอบ (RT, 37 °C และ IAT) ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลบวก (3+) ที่สถานะ indirect antiglobulin phase เท่านั้น ตัวอย่างของผลบวก ดังแสดงในรูปที่ 6

**Table 4** Results of antibody screening of virtual serum without anti-D (IgG) and with anti-D (IgG) at different dilution ratios by CAT

ซีรัมเสมือนจริง	อัตราส่วนการเจือจาง	O1	O2
		37°C	37°C
ไม่เติม anti-D (IgG) (n = 30)	undiluted	0	0
	1:2	0	0
	1:4	0	0
	1:8	0	0
เติม anti-D (IgG) (n = 30)	1:2	4+	4+
	1:4	4+	4+
	1:8	4+	4+

**Figure 7** (A) Negative results of antibody screening of virtual serum without anti-D (IgG), (B) positive results of virtual serum with anti-D (IgG) by CAT

ผลการทดสอบ antibody screening ของซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) และเติม anti-D (IgG) ทุกอัตราส่วนการเจือจาง ด้วยวิธี CAT ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ซีรัมเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) ให้ผลลบ ส่วนซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลบวก (4+) ตัวอย่างของผลลบและบวก ดังแสดงในรูปที่ 7

**Table 5** Results of antibody screening of virtual serum without anti-D (IgG) and with anti-D (IgG) at different dilution ratios by CTT and CAT

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) ทุกอัตราส่วนการเจือจาง ด้วยวิธี CTT และ CAT ให้ผลการทดสอบเป็นลบจริง ร้อยละ 100 และให้ผลการทดสอบเป็นบวกจริง ร้อยละ 100 คือไม่เกิดผล false positive และ false negative ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

มีการศึกษาเบื้องต้นในการเตรียมซีรัมเสมือนจริง เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ วิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เรื่อง antibody screening (Yothinarak & Prommano, 2017) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการใช้ซีรัมเสมือนจริงนี้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ วิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เรื่อง antibody screening ดังกล่าว พบว่าซีรัมเสมือนจริงที่ไม่มีการเติม anti-D (IgG) ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นลบทุกสถานะของการทดสอบ แต่พบว่าซีรัมเสมือนจริงดังกล่าว ให้ผลการทดสอบ antibody screening ที่สถานะอุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียส แบบปฏิกิริยา hemolysis ซึ่งจัดเป็นผลบวกปลอม เนื่องจากในการอ่านผลการทดสอบ antibody screening โดยวิธี CTT ในขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียส ต้องมีการอ่านผลปฏิกิริยา hemolysis และปฏิกิริยา agglutination ดังนั้นถ้าซีรัมเสมือนจริงที่ไม่มี unexpected antibody ทำให้ screening cells แดก จะทำให้การอ่านผลเป็นปฏิกิริยา hemolysis ซึ่งเป็นผลบวกปลอม อย่างไรก็ตามซีรัมเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) ให้ผลการทดสอบ antibody screening ที่เป็นบวกทุกสถานะของการทดสอบและไม่พบผลลบปลอม

จากงานวิจัยเพื่อพัฒนาการเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่ไม่มีการเติม anti-D (IgG) โดยการเติมอัลบูมิน ปริมาณ 0.5 กรัม/เดซิลิตร ของซีรัมเสมือนจริง พบว่าผลการทดสอบ antibody screening ไม่พบผลบวกปลอมจากการที่เม็ดเลือดแดงของ screening cells แดกจากสารละลายของซีรัมเสมือนจริง ใน



ทุกสถานะของการทดสอบ (Yothinarak, 2018) เนื่องจากอัลบูมินมีราคาแพง งานวิจัยนี้จึงแนวคิดที่จะลดปริมาณของอัลบูมินเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการเตรียมซีรัมเสมือนจริง ซึ่งผู้วิจัยวางแผนที่จะลดปริมาณของอัลบูมินเป็น 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 กรัม/เดซิลิตร โดยเตรียมซีรัมเสมือนจริงที่เติมอัลบูมิน 0.1 กรัม/เดซิลิตร ก่อน ถ้าผล antibody screening พบเม็ดเลือดแดงของ screening cells ตก จะเพิ่มปริมาณของอัลบูมินเป็น 0.2, 0.3 และ 0.4 และติดตามดูผลของ antibody screening ตามลำดับต่อไป นอกจากนี้การศึกษานี้ได้เพิ่มการเจือจางซีรัมเสมือนจริง เพื่อสร้างซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองที่แตกต่างกัน เพื่อเป็น unknown ได้หลายสิ่งตัวอย่าง เหมือนกับซีรัมจริงที่ได้จากมนุษย์ที่มีทั้งสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน เพื่อให้ให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการเรื่อง antibody screening โดยนักศึกษาไม่ทราบว่าเป็น unknown ที่ได้ทำการทดสอบไม่ใช่ซีรัมจริงที่ได้จากมนุษย์ โดยการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ผลการศึกษาพบว่าการทดสอบ antibody screening ไม่พบเม็ดเลือดแดงของ screening cells ตก แสดงว่าสามารถเตรียมซีรัมเสมือนจริงโดยการเติมอัลบูมิน 0.1 กรัม/เดซิลิตร โดยกลไกของอัลบูมินที่ทำให้เม็ดเลือดแดงไม่ตกนั้น ยังไม่มีการบอกถึงกลไกที่ชัดเจน แต่กล่าวถึงอัลบูมินช่วยลดการบวมของเม็ดเลือดแดง และป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงจาก mechanical hemolysis (Butler, 1992; Reinhart et al., 2015) ซึ่งโดยปกติแล้วหน้าที่ของอัลบูมินเมื่ออยู่ในหลอดเลือดจะทำหน้าที่รักษา oncotic pressure ซึ่ง oncotic pressure คือแรงที่ทำให้ของเหลวในหลอดเลือดไม่รั่วไหลออกจากหลอดเลือด แรงนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัลบูมิน (Caironi & Gattinoni, 2009) ผู้วิจัยจึงตั้งข้อสังเกตว่าอัลบูมินที่เติมเข้าไปในซีรัมเสมือนจริง อาจมีผลต่อน้ำในเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงไม่บวม เม็ดเลือดแดงจึงไม่แตก

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบซีรัมเสมือนจริงที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกสำหรับการทดสอบ antibody screening โดยการวัดค่า optical density (OD) ที่ 450 nm ค่า specific gravity (Sp.Gr.) และ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT จำนวนอย่างละ 30 ครั้ง ซึ่งการใช้ขนาดตัวอย่างมากกว่าหรือเท่ากับ 30 การกระจายของการสุ่มตัวอย่างจะเป็นไปตามการกระจายแบบปกติโดยประมาณ ขนาดตัวอย่าง 30 จึงมีขนาดใหญ่เพียงพอ (Turney, 2023) อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการศึกษาต่อไป ควรเพิ่มขนาดตัวอย่างให้มากขึ้น เพราะยิ่งขนาดตัวอย่างมีขนาดใหญ่ การกระจายของการสุ่มตัวอย่างก็จะใกล้เคียงกับการกระจายปกติมากขึ้น

ซีรัมเสมือนจริงในงานวิจัยนี้มีเจดของสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน ซึ่งพบได้จากซีรัมจริงที่ได้จากมนุษย์ โดยการศึกษานี้ใช้การวัดสีในซีรัมเสมือนจริง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีใช้อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการวิชาเคมีคลินิก ของคณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยรังสิต เครื่องนี้เป็นอุปกรณ์ที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงในตัวอย่าง โดยช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 450 นาโนเมตร สีของแสงที่มองเห็นซึ่งถูกดูดกลืนโดยสารละลาย คือ สีน้ำเงิน ส่วนสี



ของสารละลายเมื่อแสงที่มองเห็นเคลื่อนที่ผ่านคือ สีเหลือง ซึ่งคือสีของสารละลายซีรัมเสมือนจริง ทำให้สามารถประเมินความแตกต่างของสีเหลืองและสีเหลืองอ่อนได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยซีรัมเสมือนจริงที่มีสีเหลืองอ่อนจะให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่าซีรัมเสมือนจริง ทำให้การแปลผลในเชิงปริมาณเป็นไปได้อย่างชัดเจน

ขอบเขตของการศึกษานี้เป็นการเตรียมสิ่งตัวอย่างชนิดซีรัม โดยการทำให้ซีรัมเสมือนจริงที่มีลักษณะทางกายภาพด้านสีและความขุ่นที่เหมือนกับซีรัมจริงที่ได้จากมนุษย์ คือมีสีเหลืองที่มีเฉดสีเหลืองและสีเหลืองอ่อน และมีความขุ่นเล็กน้อย เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่อง antibody screening ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยให้ผลการทดสอบที่เป็นลบทุกสถานะของการทดสอบและบวกที่สถานะ indirect antiglobulin phase โดยวิธี CTT และให้ผลการทดสอบที่เป็นลบและบวกโดยวิธี CAT โดยแอนติบอดีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เพื่อให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นบวก คือ anti-D (IgG) ผลลัพธ์จากงานวิจัยนี้แสดงว่าซีรัมเสมือนจริงนี้สามารถเป็นสิ่งตัวอย่างเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้ใช้ซีรัมจริงที่ได้จากเลือดของมนุษย์เพื่อเปรียบเทียบผลลัพธ์กับซีรัมเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นจากการศึกษานี้ ทั้งนี้ซีรัมจริงที่มี unexpected antibody ต้องติดต่อขอจากห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาลที่มีผู้ป่วยที่รับส่วนประกอบของเลือดชนิดเม็ดเลือดแดงเพื่อรักษาภาวะซีด โดยต้องขอจริยธรรมการวิจัยในคน ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

การที่จะนำซีรัมเสมือนจริงไปใช้ในสถานพยาบาลจริงนั้น ผู้วิจัยเสนอว่าน่าจะอยู่ในรูปแบบของการใช้ซีรัมเสมือนจริงเป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อทดสอบว่าการทดสอบ antibody screening ที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น ได้ผลการทดสอบตรงตามที่คาดหวังไว้หรือไม่ ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สรุป ซีรัมเสมือนจริงที่มีอัตราส่วนการเจือจางที่แตกต่างกัน ให้ลักษณะสีเหลืองที่แตกต่างกัน และให้ผลการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT ที่เป็นผลลบและผลบวกได้จริง โดยไม่เกิดผลลบปลอมและผลลบปลอม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท Ortho Clinical Diagnostics (THAILAND) ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ สำหรับการทดสอบโดยวิธี column agglutination technique (CAT)



References

- Butler, T., Bradley, C.A. & Owensby, J.E. (1992). Plasma components protect erythrocytes against experimental haemolysis caused by mechanical trauma and by hypotonicity. *Int J Exp Pathol*, 73(1), 27-33.
- Caironi, P. & Gattinoni, L. (2009). The clinical use of albumin: the point of view of specialist in intensive care. *Blood transfusion*, 7, 259-267.
<https://doi.org/10.2450/2009.0002-09>
- Kim, H.N. & Ko, D.H. (2024). Transfusion-transmitted infections. *Blood Res.*
<https://doi.org/10.1007/s44313-024-00014-w>
- Lapierre, Y., Rigal, D., Adam, J., Josef, D., Meyer, F., Greber, S., & Drot, C. (1990). The gel test: a new way to detect red cell antibody reactions, *Transfusion*, 30(2), 109-113.
- Na Thalung, O. (1993). Application of the Gel test for antibody screening and identification. *J Hematol Transfus Med*, 3(4), 299-306.
- Reinhart, W.H., Piety, N.Z., Deuel, J.W., Makhro, A., Schulzki, T., Bogdanov, N., Goede, J.S., Bogdanova, A., Abidi, R. & Shevkopyas, S.S. (2015). Washing stored red blood cells in an albumin solution improves their morphologic and hemorheologic properties. *Transfusion*, 55(8), 1872-1881.
- 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.
- Yimklib, W. (2023). Research competency: routine to research (R2R). *Lawarath Social E-Journal*, 5(1), 175-191.
- 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).
- 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).