การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยา anti-A เสมือนจริง เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่องการยืนยัน Weak A โดยวิธี Adsorption และ Elution ในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2

Preparation of Red Blood Cells and Virtual anti-A Reagent for Laboratory Instruction of the Confirmation Weak A by Adsorption and Elution in Transfusion Science II Subject

อังสนา โยธินารักษ์* และ อรนันท์ พรหมมาโน

Aungsana Yothinarak* and Oranan Prommano

อาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

Lecturer of Faculty of Medical Technology Rangsit University

**Corresponding author, E mail:aungsana.y@rsu.ac.th*

บทคัดย่อ

การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการของวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในหัวข้อ confirming weak A by adsorption and elution มีประโยชน์ในการตรวจยืนยันว่าแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นชนิด weak A หรือ A subgroups แต่มีข้อจำกัดในการการเตรียมตัวอย่างตรวจจากเลือดของผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดดังกล่าว เพราะเป็นหมู่เลือดที่พบได้น้อยและต้องเจาะเก็บเลือดจากผู้ป่วยปริมาณมากถึงจะเพียงพอที่จะให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติจริง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยา เพื่อใช้ในการทดสอบยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution

การศึกษานี้ใช้เลือดหมู่ A จำนวน 3 ถุง ที่หมดอายุไม่เกิน 3 วัน จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยทำการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยน้ำยา anti-A (IgM monoclonal) ที่เรียงความเข้มข้นแบบ serial two fold dilution จากนั้นเลือกความเข้มข้นที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า เพื่อนำมาติดตามเซลล์เม็ดเลือดแดงว่ามีแอนติบอดีจับอยู่หรือไม่ โดยวิธี Cold-acid elution, Glycine-HCL/EDTA elution, Heat elution และ Lui freeze-thaw elution และวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าคะแนนรวม agglutination ที่ได้จากการ elution ทั้ง 4 วิธี โดย Kruskal-Wallis test ผลการวิจัยพบว่า การ sensitization โดยไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination และให้ผลคะแนนของ agglutination จากการ elution บางวิธี อยู่ในช่วงค่าความเจือจางของน้ำยา anti-A ตั้งแต่ 1:32 - 1:512 และการ elution ทั้ง 4 วิธีมีค่าคะแนนรวมของ agglutination แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี glycine-HCL/EDTA elution เป็นวิธีที่ให้ค่าคะแนนรวมของ agglutination สูงที่สุด ดังนั้นวิธี glycine-HCL/EDTA elution จึงเป็นวิธีที่นำแอนติบอดีที่จับอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาได้ดีที่สุด ผู้วิจัยได้สร้างสถานการณ์โดยให้ผู้ช่วยวิจัย 4 คนทำการทดสอบเพื่อยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ glycine-HCL/EDTA elution และ Heat elution โดยใช้เลือดหมู่ A เพิ่มอีกจำนวน 3 ถุง ที่หมดอายุไม่เกิน 3 วัน จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล และใช้ น้ำยา anti-A ค่าความเจือจาง 1:32 และ 1:64 ที่ได้เติมสีผสมอาหารสีฟ้า จนมีสีเสมือนจริงกับน้ำยา anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง ผลการศึกษาพบว่า น้ำยา anti-A

มหาวิทยาลัยรังสิต

ค่าความเจือจาง 1:64 สามารถ sensitized เซลล์เม็ดเลือดแดง ได้ โดยไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination และวิธี glycine-HCL/EDTA elution เป็นวิธีที่นำแอนติบอดีที่จับอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาได้ ผลจากงานวิจัยนี้น่าจะเป็นแนวทางให้มีการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยาเพื่อใช้ในการทดสอบยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution ได้

คำสำคัญ: *วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต2 เซลล์เม็ดเลือดแดง น้ำยา anti-A เสมือนจริง*

Abstract

In a laboratory study in transfusion science II of the Faculty of Medical Technology, Rangsit University, there is a topic of confirming weak A by adsorption and elution. This is a useful method to detect weak A or A subgroups on red blood cells. However, there are limitations in the preparation of specimen collected from the patients. A subgroup is the rare blood group and must be collected from the patients in large volume for a lot of students. The objective of this study is to prepare of red blood cells and reagent for confirming weak A by adsorption and elution.

In this study, 3 bags of expired blood less than 3 days from the blood bank of the hospital were used. Red blood cells were sensitized with serial two-fold dilutions of anti-A (IgM monoclonal). The appropriate dilutions in which the agglutination could not be seen were monitored to see whether or not antibody coated red blood cells were coated by antibody using four methods of elution, i.e. Cold-acid elution, Glycine-HCL/EDTA elution, Heat elution, and Lui freeze-thaw elution. The difference of total agglutination scores from four methods of elution were statistical analyzed by using Kruskal-Wallis test. The results showed that the sensitization with invisible agglutination and gave agglutination scores from some methods of elution were in range of anti-A dilutinon from 1:32 - 1:512. There were statistically significant difference in total agglutination scores from four methods of elution ($p < 0.05$). The Glycine-HCL/EDTA elution gave the highest agglutination scores. Therefore, Glycine-HCL/EDTA elution was the best method for eluting antibody from red blood cells. We designed a situation by setting 4 assistant researchers for confirming weak A by adsorption and elution; Glycine-HCL/EDTA elution and Heat elution by using additional 3 bags of expired blood less than 3 days from the blood bank of the hospital and diluted anti-A at 1:32 and 1:64 with blue dye for being virtual anti-A. The result showed that diluted anti-A at 1:64 sensitized red blood cells with invisible agglutination and Glycine-HCL/EDTA elution was the method for eluting antibody from red blood cells. This study may provide a way for preparation of red blood cells and reagent for confirming weak A by adsorption and elution.

Keywords: *transfusion science II, red blood cells, virtual anti-A*

มหาวิทยาลัยรังสิต

1. บทนำ

การเรียนการสอนวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในหัวข้อเรื่องการ confirming weak A by adsorption and elution มีประโยชน์เพื่อช่วยในการตรวจหาแอนติเจน A ที่มีปริมาณน้อย ๆ (weak A) บนเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถพบได้ในผู้ที่มีหมู่เลือดเป็น A subgroups (จินตนา, 2010) ซึ่งการจำแนก A subgroups ด้วยการใช้น้ำยา monoclonal anti-A ในห้องปฏิบัติการทั่วไปมีความแรงในการเกิดปฏิกิริยาได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปริมาณแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มากน้อยแตกต่างกัน ในกรณีที่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงของบุคคลนั้นเป็น weak A อาจทำให้เกิดความไม่สอดคล้องกันของผลการตรวจ cell grouping และ serum grouping ที่เรียกว่า ABO discrepancies (ปรียานาถ, 2007) ส่งผลให้การวินิจฉัยหมู่เลือด ABO ผิดพลาดได้

การตรวจยืนยันเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด weak A ด้วยวิธี adsorption และ elution จะแบ่งการทดสอบเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกเป็นการทำ adsorption โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด weak A มาทำปฏิกิริยากับน้ำยา anti-A เพื่อทำให้ anti-A ที่จำเพาะกับแอนติเจน A บนเซลล์เม็ดเลือดแดงมีโอกาสเกาะกันได้มากขึ้น แต่ในขั้นตอนนี้จะยังไม่เห็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (antibody sensitized RBC) จากนั้นจะใช้เทคนิคการ elution เพื่อทำให้แอนติบอดีซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วหลุดออกมาซึ่งสามารถทำได้ด้วยวิธีทางกายภาพ (George, 2006) เช่น ใช้ความร้อน (heat) คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) การแช่แข็งหรือการละลาย (freeze and thaw) หรือวิธีทางเคมี เช่น การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง การใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง หรือการสารใช้เคมีต่างๆ เช่น chloroform ether xylene หรือ chloroquine diphosphate ทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง (George, 2006) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน และแต่ละวิธีก็ไม่สามารถแยกแอนติบอดีออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงได้เหมือนกัน ปัจจุบันเทคนิคการ elution ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี เช่น Cold-Acid elution, Glycine-HCl/EDTA elution, Heat elution และ Lui Freeze-Thaw elution (Roback *et al*., 2011)

การเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยปกติจะต้องมีการจัดหาเลือด A subgroups ที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ weak A ซึ่งการเตรียมตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยที่มีหมู่เลือดเป็น A subgroups มีข้อจำกัดคือ เป็นหมู่เลือดที่พบน้อยโดย A subgroups พบได้ร้อยละ 20 ของหมู่เลือด A (จินตนา, 2010) ดังนั้นการเรียนการสอนปฏิบัติการในหัวข้อนี้ที่ผ่านมาจึงใช้รูปแบบการทำงานเป็นกลุ่ม เนื่องจากจะต้องใช้เลือดไม่น้อยกว่า 240 มิลลิลิตร จึงจะเพียงพอต่อการจัดการเรียนการสอนสำหรับนักศึกษาชั้นปีที่ 3 ประมาณ 140 คนได้ทำตัวอย่างครบทุกคน ซึ่งการเจาะเลือดจากผู้ป่วย หรือผู้บริจาคในปริมาณมากไม่สามารถทำได้เพราะอาจเป็นอันตรายแก่ผู้ป่วย และเป็นการไม่เหมาะสมที่จะนำเลือดผู้บริจาคโลหิตมาใช้แทนการนำไปรักษาผู้ป่วย แต่เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติจริงและเป็นการเตรียมความพร้อมด้านเทคนิคพิเศษเกี่ยวกับ adsorption และ elution เพื่อที่นักศึกษาจะสามารถปฏิบัติงานได้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาลต่อไป

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะหาแนวทางในการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงเพื่อใช้ในการเรียนการสอนหัวข้อการทดสอบเพื่อยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption and elution และประเมินวิธี elution ที่เหมาะสมในการแยกแอนติบอดีออกจากแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยการใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดหมู่ A ที่หมดอายุไม่เกิน 3 วันเนื่องจากมีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ถ้าถุงเลือดหมดอายุนานกว่า 3 วันจะมีการแตกของเม็ดเลือดแดงมาก ทำให้ต้องใช้เวลาในการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงนานเกินไป และเมื่อทำขั้นตอน adsorption จะสูญเสียเซลล์ที่มีแอนติบอดีที่เกาะอยู่ได้ง่าย

มหาวิทยาลัยรังสิต

(ปิยวัฒน์, 2013) ทำให้ลดประสิทธิภาพของการทดสอบในขั้นตอน elution ได้ เพราะในขั้นตอนของ adsorption จะต้องไม่เห็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) ด้วยตาเปล่าเพื่อให้เสมือนสถานการณ์จริง ที่เป็น weak A และผลจากการ adsorption เพื่อให้ anti-A เกาะอยู่บนเซลล์เม็ดแดงหมู่ A ที่ผู้วิจัยสร้างขึ้นมา จะเข้าสู่การตรวจหาว่ามี anti-A บนเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือไม่ โดยเทคนิค elution ต่อไป ผลจากงานวิจัยนี้ จะใช้เป็นแนวทางในการจัดเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการจัดการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 ให้แก่นักศึกษาของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ A และน้ำยา diluted anti-A ที่เสมือนจริงกับน้ำยา anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง เพื่อใช้ในการทดสอบยืนยัน weak A ในขั้นตอน adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุแล้วจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล

2. เพื่อประเมินวิธี elution ที่เหมาะสม ในการแยกแอนติบอดีออกจาก ant-A sensitized red blood cells ที่ผ่านการ adsorption ด้วยน้ำยา diluted anti-A โดยใช้วิธี elution 4 วิธี ได้แก่ Cold-Acid elution, Glycine-HCl/EDTA elution, Heat elution, Lui Freeze-Thaw elution

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เกณฑ์การเลือกเลือดจากถุงเลือดที่หมดอายุแล้ว จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยเลือกเลือดผู้บริจาคหมู่เลือด A ที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยผู้วิจัยตั้งเกณฑ์ว่าไม่ควรหมดอายุนานเกิน 3 วันเพื่อไม่ให้เลือดเก่าจนเกินไป จำนวน 3 ถุงเพื่อใช้ในการทดลองหาค่าการเจือจางของน้ำยา anti-A ที่เหมาะสมโดยเมื่อนำเซลล์เม็ดเลือดแดงมาทำการ adsorption กับน้ำยา diluted anti-A แล้วหา dilution ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination จากนั้นประเมินผลของการ adsorption ด้วยวิธีการ elution ทั้ง 4 วิธี ได้แก่ Cold-Acid elution, Glycine-HCl/EDTA elution, Heat elution, Lui Freeze-Thaw elution

3.2 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยาสำหรับการทดสอบเพื่อตรวจยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution

3.2.1 การ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยน้ำยา anti-A โดยการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดหมดอายุโดยนำเลือดจากถุงเลือดหมู่ A ใส่ลงในหลอดทดลอง ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง จนกว่าน้ำใสส่วนบนจะไม่มีสีแดง ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นทำการ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่เลือด A โดยการเตรียมน้ำยา anti-A แบบ serial two fold dilution ด้วย 0.85% NaCl (w/v) ดังนี้ undiluted, 1:2, 1:4., 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 เตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง จำนวน 10 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำยา anti-Aที่เจือจางแล้ว จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองตามลำดับค่าการเจือจาง เขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอดทดลองไปมา จดบันทึกหลอดที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า นำไปใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วย 0.85% NaCl (w/v) จำนวน 8 ครั้ง โดยเก็บน้ำล้างทุกครั้ง เพื่อตรวจว่ามี excess antibody หรือไม่ โดยนำมาทดสอบกับเซลล์มาตรฐาน คือ 3% A cells

การ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุ ด้วย diluted anti-A จะทำซ้ำสองทุกถุงเลือด

มหาวิทยาลัยรังสิต

3.2.2 การ elution anti-A ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยเลือกหลอดทดลองจากทุก dilution ของ anti-A ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination หลังจากการ adsorption แล้วในข้อที่ 3.2.1 มาทำการ elution โดย 4 วิธี ดังนี้

3.2.2.1 Cold-acid elution (Roback *et al*., 2011)

แช่ Glycine-HCl และน้ำเกลือ ในอ่างน้ำแข็ง เติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ adsorption ในข้อ 3.2.1 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีเติมน้ำเกลือเย็น 1 มิลลิลิตร เติม Glycine-HCl เย็น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาทีปั่นทันทีที่ 900 g นาน 2 นาที ย้ายน้ำใสส่วนบนใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด เติม phosphate buffer pH 8.2 0.1 มิลลิลิตร ต่อน้ำใสส่วนบน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 900 g นาน 2 นาที ย้ายน้ำใสส่วนบน ที่เรียกว่า eluate ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาดทดสอบ eluate คู่กับ น้ำล้างครั้งสุดท้ายในขั้นตอนการ adsorption ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรฐาน 3% A cells และ 3% O cells ในอัตราส่วน eluate 2 หยด ต่อ 3% A cells และ 3% O cells 1 หยด แล้วปั่นอ่านผลปฏิกิริยา agglutination แบบทันที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ถ้าไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ยืนยันผลโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกผล

3.2.2.2 Glycine-HCl/EDTA elution (Roback *et al*., 2011)

ผสม 0.1 M glycine-HCl buffer จำนวน 20 หยดและ 10% EDTA จำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากันเพื่อเตรียมเป็น eluting solution เติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ adsorption ในข้อ 3.2.1 จำนวน 10 หยดลงในหลอดทดลอง เติม eluting solution จำนวน 20 หยด เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันและนำไปอุ่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาทีเติม TRIS-NaCl 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน ปั่นทันทีที่ 900 g นาน 1 นาที ย้าย supernatant eluate ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด และปรับให้ pH อยู่ระหว่าง 7.0-7.4 ด้วย 1 M TRIS-NaCl โดยตรวจสอบด้วย pH paper (ค่อยๆ เติมทีละหยด) ปั่นที่ 900 g นาน 2 นาที ย้าย supernatant eluate ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาดและนำไปทดสอบคู่กับน้ำล้างสุดท้ายในขั้นตอนการ adsorption ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรฐาน 3% A cells และ 3% O cells ทำนองเดียวกับวิธี Cold-Acid elution ข้อ 3.2.2.1

3.2.2.3 Heat elution (Roback *et al*., 2011)

ผสมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ adsorption ในข้อ 3.2.1 1 มิลลิลิตร และ 6% bovine albumin 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอุ่นที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา ปั่นที่ 900 g นาน 2 นาที ย้าย supernatant eluateใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาดและนำไปทดสอบคู่กับน้ำล้างสุดท้ายในขั้นตอนการ adsorption ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรฐาน 3% A cells และ 3% O cells ทำนองเดียวกับวิธี Cold-Acid elution ข้อ 3.2.2.1

3.2.2.4 Lui Freeze-Thaw elution (Roback *et al*., 2011)

ผสมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ adsorption ในข้อ 3.2.1 0.5 มิลลิลิตร และ 0.85% NaCl (w/v) 3 หยดเขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มให้สนิท เอียงหลอดให้สารละลายเคลือบบนผนังหลอดเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงได้สัมผัสกับผนังหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -6 ถึง-70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยวางหลอดทดลองในแนวนอน นำหลอดทดลองออกจากตู้แช่แข็งและนำมาละลายโดยนำหลอดทดลองผ่านน้ำประปาอย่างรวดเร็ว ย้าย supernatant eluateใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาดและนำไปทดสอบคู่กับน้ำล้างสุดท้ายในขั้นตอนการ adsorption ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงมาตรฐาน 3% A cellsและ 3% O cells ทำนองเดียวกับวิธี Cold-Acid elution ข้อ 3.2.2.1

3.3 การอ่านผล

อ่านผลโดยเขย่าหลอดเบา ๆ ถ้าดูด้วยตาเปล่า ไม่พบปฏิกิริยา agglutination ให้ดูต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยผลบวกมีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง การแจกแจงปฏิกิริยาผลบวก ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การอ่านผลปฏิกิยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination)

เกรด	คะแนน	ลักษณะที่พบ
4+	12	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส
3+	11	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส
2+	9	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส
1+	6	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กหลายก้อน น้ำขุ่นและมีสีแดง
w	2	เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอ มองด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง จะเห็นได้ชัด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำขุ่นและมีสีแดง

3.4 การแปลผลการทดสอบ elution ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแปลผลการทดสอบ elution

การทำปฏิกิริยา	การพบ agglutination	การบ่งชี้และการแปลผล
Eluate + 3% A cells Eluate + 3% O cells น้ำล้างครั้งสุดท้าย + 3% A cells	✓ ✗ ✗	พบแอนติเจน A บนเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบ แปลผลได้ว่าเป็นหมู่เลือด A subgroups
Eluate + 3% A cells	✗	ไม่ปรากฏแอนติเจน A บนเม็ดเลือดแดงที่ทดสอบ หรือการelution ไม่สำเร็จ
Eluate + 3% O cells	✓	มีการปนเปื้อนแอนติบอดีอื่น ๆ ระหว่างทำการทดลอง
น้ำล้างครั้งสุดท้าย + 3% A cells	✓	ไม่สามารถแปลผลการทดสอบ

✓หมายถึง เห็นปฏิกิริยา agglutination

✗ หมายถึง ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination

ค่าคะแนนของ agglutination ที่ได้จาก elution ในทุก dilution ของ anti-A ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination หลังจากการ adsorption แล้วในข้อที่ 3.2.1 จะนำมารวมกันเป็นค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ elution

3.5 การสร้างสถานการณ์จำลองในการตรวจยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution โดยใช้น้ำยา diluted anti-A ที่จำลองขึ้นมาให้มีสีเสมือนน้ำยา anti-A ที่ใช้จริงทางห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด

เมื่อทำ การทดลองหา dilution ที่เหมาะสมของน้ำยา anti-Aได้แล้ว สีของน้ำยา diluted anti-A ที่ได้จะมีสีฟ้าที่อ่อนลง ซึ่งการทดสอบในสถานการณ์จริง เพื่อยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution จะใช้น้ำยา undiluted anti-A ทีมีสีฟ้าใส ผู้วิจัยจึงเตรียมน้ำยา diluted anti-A ให้มีสีเหมือนสถานการณ์จริง โดยจะเลือกจำลองน้ำยา anti-A ที่เหมาะสม ที่ dilution ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า จากผลการทดลองของข้อ 3.2.1 จากนั้นนำมาเตรียมให้มีสีเสมือนจริงกับ anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง โดยผู้วิจัยได้ทดลองใช้ 0.85% NaCl (w/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับ

มหาวิทยาลัยรังสิต

สีผสมอาหารสีฟ้าปริมาณ 0.002 g พบว่ามีสีใกล้เคียงกับน้ำยา anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง ซึ่งจะได้ใช้สีผสมอาหารสีฟ้าปริมาณ 0.002 g นี้ เติมลงใน diluted anti-A ที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ต่อไป

ในสถานการณ์จริงในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 เรื่องการทดสอบยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution ผู้สอนจะให้นักศึกษาได้ทำการทดลองเทคนิค adsorption และ elution ด้วยตนเอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ทีมผู้ช่วยวิจัย 4 คน ลองทำการทดสอบ ยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution ด้วยวิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ Heat elution โดยใช้ถุงเลือดผู้บริจาคหมู่เลือด A ที่หมดอายุจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ไม่เกิน 3 วัน เพิ่มเติมอีกจำนวน 3 ถุง ขั้นตอนการ adsorption จะทำในทำนองเดียวกับข้อ 3.2.1โดยใช้น้ำยา diluted anti-A ที่เสมือนจริง ส่วนขั้นตอนการ elution จะทำในทำนองเดียวกับข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.2.3 การทดสอบทั้งหมดจะทำซ้ำสองครั้ง

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 รายงานค่ากลางของข้อมูลในรูป median (min, max)

การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ elution 2 วิธี ใช้สถิติทดสอบ คือ Mann-Whitney test ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ elution ทั้ง 4 วิธี ใช้สถิติทดสอบ คือ Kruskal-Wallis test ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัย

4.1 การ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน A ด้วย diluted anti-A

ถุงเลือดถุงที่ 1 เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง undiluted, 1:2, 1:4 และ 1:8 ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-Aที่ค่าความเจือจาง 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ 1:512 ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 ชุดของการทดลอง

ถุงเลือดถุงที่ 2 เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-Aที่ค่าความเจือจาง 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ 1:512 ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 ชุดของการทดลอง

ถุงเลือดถุงที่ 3 เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจางundiluted, 1:2, 1:4 และ 1:8 ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 และ 1:512 ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 ชุดของการทดลอง

สรุปผลจากการศึกษาการนำเซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุไม่เกิน 3 วัน จำนวน 3 ถุง มา adsorption กับน้ำยา anti-A ที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ค่าการเจือจางของน้ำยา anti-A ที่เหมาะสมที่ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า อยู่ระหว่าง dilution ที่ 1:32-1:512 ดังแสดงในตารางที่ 3

มหาวิทยาลัยรังสิต

ตารางที่ 3 การเห็นปฏิกิริยา agglutination ที่น้ำยา anti-A ค่าความเจือจางต่าง ๆ

ถุงเลือด	ชุดที่	undiluted	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	1	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	2	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
2	1	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗
3	1	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
	2	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗

✓หมายถึง เห็นปฏิกิริยา agglutination

✗ หมายถึง ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination

4.2 การ elution ant-A ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

จากการคำนวณหาค่า median (min,max) ของค่าคะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ที่ได้จากการ elution ทั้ง 4 วิธีจากถุงเลือด 3 ถุง โดยคิดคะแนนจาก diluted anti- A ที่เมื่อเติมลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบว่า

Cold-Acid elution และวิธี Lui Freeze-Thaw elution ให้ค่าเท่ากับ 0 (0,0) ทุกสถานะ แสดงว่า elution 2 วิธีนี้ไม่สามารถ elute นำเอาแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาได้

Glycine-HCl/EDTA elution และวิธี Heat elution มีค่าคะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ที่สถานะต่างๆ แสดงว่า elution 2 วิธีนี้สามารถ elute นำเอาแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาได้ ซึ่งวิธี Glycine-HCl/EDTA elution เป็นวิธีที่ให้ผลคะแนนปฏิกิริยา agglutination มากที่สุด แสดงว่าวิธีนี้เป็นวิธี elution ที่ดีที่สุด

ผู้วิจัยได้ทำการ เปรียบเทียบค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ที่ได้จากการ elution ทั้ง 4 วิธี พบว่าได้ค่า p = 0.000 แสดงว่า การ elution ทั้ง 4 วิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองพบว่าวิธีที่สามารถ elute นำเอาแอนติบอดีออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ได้แก่วิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ Heat elution ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเปรียบเทียบ การ elution ของ 2 วิธีนี้ พบว่าที่สถานะปั่นอ่านผลทันที (immediate spin : IS),ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) 30 นาทีและ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่า p = 0.003, 0.003 และ 0.004 ตามลำดับ แสดงว่า การ elution ทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี Glycine-HCl/EDTA elution มีคะแนนปฏิกิริยา agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าวิธี Heat elution ทุกสถานะ

มหาวิทยาลัยรังสิต

ตารางที่ 4 ค่า median (min-max) ของปฏิกิริยา agglutination ที่ได้จากการ elution ทั้ง 4 วิธี

Sample	Phase	Cold-Acid elution	Glycine-HCl/EDTA elution	Heat elution	Lui-Freeze Thaw elution	p
		Median (min,max)	Median (min,max)	Median (min,max)	Median (min,max)	95% CI
Blood bag (n=3)	IS	0(0,0)	22.5[a] (12.5,25.5)	0[a] (0,6)	0(0,0)	0.000
	RT 30 นาที	0(0,0)	24.0[b](22.5,25.5)	0[b](0,6)	0(0,0)	0.000
	4°C 30 นาที	0(0,0)	33.0[c](30.0,29.5)	6[c](0,8)	0(0,0)	0.000

a = วิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ วิธี Heat elution ผลที่ IS มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.003)

b = วิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ วิธี Heat elution ผลที่ RT 30 นาทีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.003)

c = วิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ วิธี Heat elution ผลที่ 4°C มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.004)

4.3 การ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:32 และ 1:64 ที่มีสีเสมือนจริงกับน้ำยา anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง

จากผลการทดลอง ในตารางที่ 3 ผู้วิจัย เลือกจำลองน้ำ ยา anti-A ที่มี dilution เท่ากับ 1:32 และ 1:64 ซึ่งเป็น dilution ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า โดยเตรียมให้มีสีเสมือนจริงกับ anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง โดยการเตรียม diluted anti-A ที่ dilution 1:32 และ 1:64 ปริมาตร 200 mL ผสมกับสีผสมอาหารสีฟ้าปริมาณ 0.002 g ผลการทดลอง ดังนี้

ถุงเลือดถุงที่ 1 ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:32 และ 1:64 โดยผู้วิจัยทั้ง 4 คน ให้ผลเหมือนกัน

ถุงเลือดถุงที่ 2 และ 3 เห็นการเกิดเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:32 ไม่เห็นการเกิดเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:64 โดยผู้วิจัยทั้ง 4 คน ให้ผลเหมือนกัน

สรุปผลจากการศึกษาการบำเซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุไม่เกิน 3 วันจำนวน 3 ถุง มา adsorption กับน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจางที่ 1:32 และ 1:64 พบว่า ค่าการเจือจางของน้ำยา anti-A ที่เหมาะสมที่ไม่เห็นการเกิดปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า อยู่ที่ 1:64 ดังแสดงในตารางที่ 5

มหาวิทยาลัยรังสิต

ตารางที่ 5 ปฏิกิริยา agglutination ที่ค่าความเจือจาง 1:32 และ 1:64

ถุงเลือดที่	ผู้วิจัยคนที่	1:32	1:64
1	1	✗	✗
	2	✗	✗
	3	✗	✗
	4	✗	✗
2	1	✓	✗
	2	✓	✗
	3	✓	✗
	4	✓	✗
3	1	✓	✗
	2	✓	✗
	3	✓	✗
	4	✓	✗

✓หมายถึง เห็นปฏิกิริยา agglutination

✗ หมายถึง ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination

4.4 การ elution โดยวิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ Heat elution จากการ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงโดยน้ำยา anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:32 และ 1:64 ที่มีสีเหมือนจริงกับน้ำยา anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง

จากค่าคะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ที่ได้จากการ elution โดยวิธี Glycine-HCl/EDTA elution และ Heat elution จากถุงเลือด 3 ถุง โดยคิดคะแนนจาก diluted anti- A ที่เมื่อเติมลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination พบว่าการเปรียบเทียบค่า median ของวิธี Glycine-HCl/EDTA elution ที่ได้จากผู้ช่วยวิจัย 4 คน (รูปที่ 1) พบว่า

ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 1 ที่สถานะปั่นอ่านผลทันที, ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่าเท่ากับ 6, 9, 9 ตามลำดับ

ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 2 ที่สถานะปั่นอ่านผลทันที, ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่าเท่ากับ 6, 6, 6 ตามลำดับ

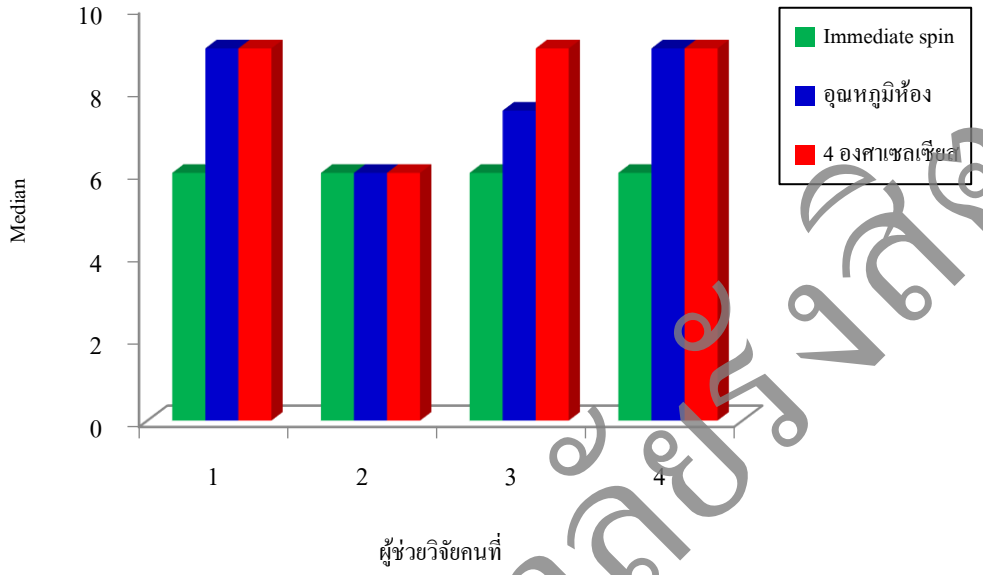
ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 3 ที่สถานะปั่นอ่านผลทันที, ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่าเท่ากับ 6, 7.5, 9 ตามลำดับ

ผู้ช่วยวิจัยคนที่ 4 ที่สถานะปั่นอ่านผลทันที, ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที มีค่าเท่ากับ 6, 9, 9 ตามลำดับ

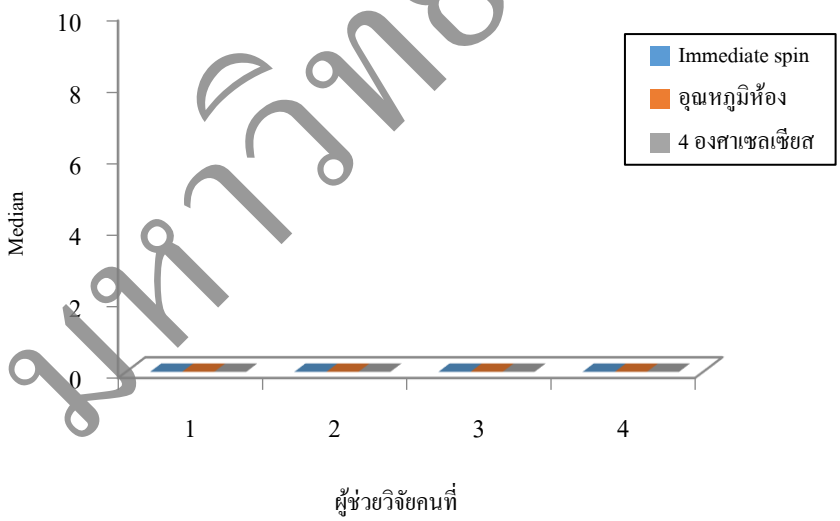
สำหรับวิธี Heat elution พบว่าผู้ช่วยวิจัยทั้ง 4 คน ไม่สามารถ elute เอาแอนติบอดีที่อยู่บนเซลล์เม็ดเลือดแดงออกมาได้ โดยพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา agglutination ทุกสถานะ (รูปที่ 2)

มหาวิทยาลัยรังสิต

สรุปผลการศึกษา การเตรียมน้ำยา diluted anti-A ที่ค่าความเจือจาง 1:64 เมื่อทำการ adsorption จะไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination และวิธี Glycine-HCl/EDTA elution เป็นวิธีที่เอาแอนติบอดีออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงได้



รูปที่ 1 แผนภูมิเปรียบเทียบค่า median ของคะแนนปฏิกิริยา agglutination ที่ได้จากวิธี Glycine-HCl/EDTA elution ของผู้ช่วยวิจัย 4 คน



รูปที่ 2 แผนภูมิเปรียบเทียบค่า median ของคะแนนปฏิกิริยา agglutination ที่ได้จากวิธี Heat elution ของผู้ช่วยวิจัย 4 คน

5. การอภิปรายผล

การศึกษาเพื่อใช้ในการเรียนการสอน โดยการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยาตรวจหมู่เลือด anti-A เพื่อใช้ในตรวจยืนยันหมู่เลือดที่เป็น weak A โดยวิธี adsorption และ elution นั้น ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน ผู้วิจัยจึงได้หาแนวทางในการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยา anti-A โดยใช้แนวคิดว่า เมื่อมีการเจือจางน้ำยา anti-A จนถึงค่า

มหาวิทยาลัยรังสิต

ความเจือจางระดับหนึ่ง และนำน้ำยาที่เจือจางได้มาผสมกับแอนติเจน A บนเซลล์เม็ดเลือดแดงของหมู่เลือด A จะไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นผลที่พบได้จริงในการ adsorption เซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ weak A กับน้ำยา anti-A นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ซึ่งถุงเลือดดังกล่าวได้มีการตรวจแล้วว่าปลอดภัยจากเชื้อที่ถ่ายทอดทางเลือด ได้แก่ เชื้อที่ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส เชื้อ HBV HCV และ HIV โดยใช้วิธีการ adsorption และติดตามผลเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยใช้เทคนิคของ elution ซึ่งการใช้ถุงเลือดที่หมดอายุจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ได้มีผู้นำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการเรียนการสอนมาแล้ว (ปิยวัฒน์, 2013) อย่างไรก็ตามถุงเลือดผู้บริจาคที่เก็บไว้นาน จะทำให้เกิด hemolysis มากขึ้น (Makroo RN, 2011) จึงต้องมีการเลือกถุงเลือดที่หมดอายุไม่นานมาทำการทดสอบ และก่อนนำมาใช้ต้องมีการล้าง hemolysis ออกเพื่อให้คงเหลือเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จะนำมาใช้ในขั้นตอน adsorption

ผลจากการศึกษาในช่วงการทดสอบถุงเลือด 3 ถุงพบว่าน้ำยา anti-A ที่ dilution ระหว่าง 1:32-1:64 น่าจะเป็น dilution ที่เหมาะสมที่สุดเพราะเมื่อนำมาทำการ adsorption กับเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่ A ที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาลแล้ว ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า และพบว่าวิธี Glycine-HCl/EDTA elution เป็นวิธีที่ดีที่สุดที่สามารถ elute นำเอาแอนติบอดีออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงได้มากที่สุด

ผลจากการสร้างสถานการณ์จำลองในการตรวจยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution โดยใช้น้ำยาที่จำลองขึ้นมาให้เสมือนน้ำยาที่ใช้จริงทางห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด พบว่าเมื่อมีการใช้เซลล์เม็ดเลือดแดง จากถุงเลือดหมู่เลือด A ที่หมดอายุ เพิ่มเติมอีกจำนวน 3 ถุง อาจทำให้ค่าการเจือจางของ anti-A ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination แตกต่างจากการทดลองในถุงเลือด 3 ถุงแรก อย่างไรก็ตามวิธี Glycine-HCl/EDTA elution สามารถนำเอาแอนติบอดีออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่สรุปว่า วิธี Glycine-HCl/EDTA elution เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเอาแอนติบอดีออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล Direct antiglobulin test บวก (Katharia R, 2013)

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากถุงเลือดหมู่เลือด A จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ที่หมดอายุไม่เกิน 3 วัน จำนวนทั้งสิ้น 6 ถุง ซึ่งแต่ละถุงเลือดอาจมีจำนวนแอนติเจน A ไม่เท่ากัน จึงทำให้ผลการทดสอบ adsorption ที่ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination แตกต่างกันบ้าง ทั้งนี้ในการเรียนการสอนจริง ก่อนการเริ่มปฏิบัติการ ผู้สอนต้องทดสอบหาค่าการเจือจางของ anti-A ที่น้อยที่สุด ที่เมื่อ sensitized แอนติเจน A แล้ว ไม่เห็นปฏิกิริยา agglutination ด้วยตาเปล่า จากนั้นจึงเติมสีผสมอาหารสีฟ้า เพื่อให้ diluted anti-A ดังกล่าว มีสีเสมือนจริงกับ anti-A ที่ไม่ได้เจือจาง มากที่สุด

การศึกษานี้เป็นเพียงแนวทางที่จะใช้ในการทดสอบในห้องปฏิบัติการการเรียนการสอน เพื่อเป็นแนวตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งจะทำให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการจริง ได้เห็นภาพของเทคนิค adsorption และ elution โดยถ้าไม่มีแนวตัวอย่างนี้ การเรียนการสอนในหัวข้อ confirming weak A by adsorption and elution จะทำในรูปแบบปฏิบัติการที่เป็นตัวหนังสือเท่านั้น อันจะทำให้นักศึกษาขาดทักษะปฏิบัติการจริง

แนวทางต่อไปในการพัฒนางานวิจัยนี้คือ การเก็บรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดแดงจากถุงเลือดที่หมดอายุไม่เกิน 3 วัน และล้าง hemolysis ออกแล้ว ให้คงสภาพเซลล์ได้นานขึ้น โดยมี hemolysis น้อยลง เพราะถ้ามีถุงเลือดที่หมดอายุน้อยลง ได้แก่ มีการบริจาคโลหิตน้อยลง ปริมาณการใช้เลือดของผู้ป่วยในโรงพยาบาลมีมากขึ้น การบริหารจัดการถุงเลือดจากผู้บริจาคโลหิตเพื่อให้แก่ผู้ป่วยของงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล มีประสิทธิภาพมากขึ้น โอกาสที่จะได้ถุงเลือดที่หมดอายุเพื่อนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการเรียนการสอนก็จะน้อยลง

มหาวิทยาลัยรังสิต

6. บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อหาแนวทางในการสร้างตัวอย่างเลือดและน้ำยา anti-A เสมือนจริง เพื่อนำมาใช้ในการสร้างสถานการณ์จำลองในการทดสอบตรวจยืนยันหมู่เลือดที่เป็น weak A โดยวิธี adsorption และ elution โดยใช้ประโยชน์จากถุงเลือดที่หมดอายุแล้วจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล เพื่อใช้ปรับปรุงวิธีการจัดการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการของวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ให้เพียงพอกับความต้องการฝึกปฏิบัติอย่างทั่วถึง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่นำมาศึกษามีจำนวนน้อย เนื่องจากมีข้อจำกัดคือ ปริมาณการใช้เลือดในโรงพยาบาลมีมาก จึงไม่มีเลือดที่หมดอายุมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ทำงานวิจัยเต็มรูปแบบได้ แต่ผลจากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ผู้สอนสามารถเตรียมตัวอย่างเลือดมาทดสอบให้กับนักศึกษาได้เพียงพอ และสามารถแปลผลการทดสอบยืนยัน weak A โดยใช้วิธี adsorption และ elution ในห้องเรียนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวปราณปรียา พรพีรวิชญ์ นายสัณหณัฐ พรสิริมงคลชัย นายสุทธิกุล อุดมเมธาภรณ์ นายศุภณัฐ วอทอง และนางสาวศุภอนงค์ นาวีว่อง ที่ให้การช่วยเหลือในการวิจัยนี้

8. เอกสารอ้างอิง

จินตนา ทับรอด. (2010). บทความฟื้นวิชา ABO subgroup. *J Hematol Transfus Med*, 20(1), 49-54

ปรียานาถ วงศ์จันทร์. (2007). ABO discrepancies: ข้อสังเกตและแนวทางแก้ปัญหา. *Bull Chiang Mai Assoc Med*, 40(2),74-86

ปิยวัฒน์ มิชสินและคณะ. (2013). การเตรียมตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกใน Direct Antiglobulin Test. ปริญญานิพนธ์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต.

Roback JD, Harris T, Grossman B, Hillyer C. (2011). Technical Manual. 17th ed. Bethesda, Md: *American Association of Blood Banks.*

George H. Roberts. (2006). Elution Techniques in Blood Bank. *Continuing Education Topics & Issues*, article 301, 28-31.

Katharia R, Chaudhary RK. (2013). Removal of antibodies from red cells : Comparison of three elution methods. Asian J of Transfus Sci, 7(1): 29-32.

Makroo RN, Raina V, Bhatia A, Gupta R, Majid A, Thakur UK et al. (2011). Evaluation of the red cell hemolysis in packed red cells during processing and storage. Asian J Transfus Sci, 5(1): 15-17.
Transfus Sci, 5(1): 15-17.

มหาวิทยาลัยรังสิต