การเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกสำหรับ Direct Antiglobulin Test เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต

Blood Sample Preparation for Positive Direct Antiglobulin Test for Laboratory Instruction in Transfusion Science Subject

อังสนา โยธินารักษ์

Aungsana Yothinarak

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี ประเทศไทย

Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Pathum Thani, Thailand

E-mail: aungsana.y@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ต้องมีการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล Direct Antiglobulin Test (DAT) บวก แต่มีข้อจำกัดที่ต้องใช้เลือดจากผู้ป่วยปริมาณมาก ถึงจะเพียงพอให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติจริง ซึ่งเป็นไปไม่ได้ในการเจาะเลือดปริมาณมากจากผู้ป่วย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก การศึกษานี้ใช้เลือดหมู่ Rh (D) positive ที่หมดอายุนาน 3, 5 และ 7 วัน จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยทำการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย anti-D (IgG) ที่เรียงความเข้มข้นแบบ serial two fold dilution จากนั้นเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงในน้ำยา alserver เพื่อรักษาสภาพเซลล์ เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน เพื่อทำการทดสอบ DAT และ elution เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก โดยใช้วิธี Cold-acid elution, Heat elution, และ Lui freeze-thaw elution การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ sensitization และการ elution เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก โดยใช้สถิติทดสอบ ได้แก่ ANOVA หรือ Kruskal-Wallis test ผลการวิจัยพบว่าการทดสอบ DAT ของเลือดที่หมดอายุนานเท่ากันและไม่เท่ากัน เมื่อเก็บเลือดที่ผ่านการ sensitization แล้ว เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน ผล ไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination สำหรับผลการทดสอบ elution ทั้ง 3 วิธี พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ในการทดสอบ elution วิธีเดียวกันและวิธีที่แตกต่างกัน สรุปผลจากงานวิจัยนี้ทำให้มีแนวทางในการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็น Rh (D) positive ด้วย anti-D (IgG) และเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงได้นาน 3 วัน การติดตามผลเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ทำได้โดยใช้เทคนิคของ elution ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution

คำสำคัญ: *วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต เลือดหมดอายุ การทดสอบ direct antiglobulin test*

Abstract

In laboratory instruction in Transfusion Science Subject, the preparation of blood samples with result of positive Direct Antiglobulin Test (DAT) is normally carried out. However, limitation in the preparation of blood samples exists due to insufficiency of blood volume collected from patients for students. In fact, it is impossible for collection a large volume of blood from the patients. The objective of this study was to prepare of blood samples for positive DAT. In this study, blood samples with Rh positive expiring 3, 5 and 7 days ago from the blood bank of the hospital were used. Red blood cells were sensitized with serial two fold dilution of anti-D (IgG) and sensitized red blood cells were preserved in alserver's solution in day 0, 1, 2 and 3 for DAT and elution of positive DAT by using cold-acid elution, heat elution, and Lui freeze-thaw elution. The difference in agglutination scores between sensitization and elution of positive DAT were statistically analyzed by using ANOVA or Kruskal-Wallis test. The results showed that the blood with similar and difference numbers of days after expiration displayed no difference in agglutination scores of DAT. In addition, the result of the preservation of sensitized red blood cells in day 0, 1, 2 and 3 displayed no statistically significant difference in the agglutination scores of DAT, and the agglutination scores obtained from those three methods of elution were not significantly different. In conclusion, this study proposed an approach for the sensitization of red blood cells of Rh (D) positive with anti-D (IgG) and recommended the preservation of sensitized red blood cells for 3 days. The positive DAT could be investigated by using cold-acid elution, heat elution and Lui freeze-thaw elution.

Keywords: *Transfusion Science, Expired Blood, Direct Antiglobulin Test*

1. บทนำ

การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต มีหัวข้อเรื่อง Direct Antiglobulin Test (DAT) ซึ่งมีประโยชน์เพื่อช่วยในการวินิจฉัย Hemolytic Disease of The Fetus and Newborn (HDFN), Hemolytic Transfusion Reaction (HTR), Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA) และ Drug-induced Immune Hemolysis (Leger, 2008) แต่การสอนในภาคปฏิบัติการจะต้องมีการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT ทั้งที่เป็นผลลบและบวกให้แก่นักศึกษา โดย DAT ที่เป็นผลบวก จะใช้ในการสอนหัวข้อเรื่อง investigation of a positive direct antiglobulin test เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการจริง เป็นการเตรียมความพร้อมที่จะไปปฏิบัติงานได้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาล การเตรียมตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ DAT ให้ผลบวก มีข้อจำกัดที่ต้องใช้เลือดจากผู้ป่วยจำนวนมาก ประมาณ 300 มิลลิลิตร ถึงจะเพียงพอต่อการสอนนักศึกษาจำนวน 150 คน ที่ลงทะเบียนเรียนในรายวิชานี้ ซึ่งเป็นไปไม่ได้ในการเจาะเลือดปริมาณมากจากผู้ป่วยที่มารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล เพราะจะเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผลการทดสอบ DAT บวก จากเลือดที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ซึ่งยังไม่มีรายงานวิจัยมาก่อน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้เคยรายงานการวิจัยที่มีการใช้เลือดที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยการ การเตรียมเซลล์เม็ด

เลือดแดงและน้ำยา anti-A เสมือนจริง เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่องการยืนยัน weak A โดยวิธี adsorption และ elution ในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2 (อังสนา โยธินารักษ์, 2560) โดยข้อดีของการใช้เลือดที่หมดอายุจากธนาคารเลือด ได้แก่ 1) ปลอดภัยจากโรคติดเชื้อที่ถ่ายทอดทางเลือด (transfusion transmitted disease) ได้แก่ เชื้อตับอักเสบบี ซีและเชื้อเอดส์ (HBV, HCV, HIV) (สมศักดิ์ โล่ห์เลขา, 2535) ซึ่งเป็นอันตรายต่อนักศึกษาและผู้สอน และ 2) มีเลือดปริมาณมากพอที่จะนำมาเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก เพื่อให้เพียงพอต่อนักศึกษาจำนวนมาก

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาแนวทางในการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก จากเลือดที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล โดยใช้ anti-D (IgG)

2. เพื่อประเมินวิธี elution ที่เหมาะสม ในการชะแอนติบอดีออกจาก anti-D sensitized red blood cells โดยใช้วิธี elution 3 วิธี ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง เพื่อเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT โดยการใช้ anti-D (IgG) ในการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่เลือด Rh (D) positive จากเลือดที่หมดอายุจากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล จากนั้นติดตามผลการ sensitization โดยใช้เทคนิค elution ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution

กลุ่มตัวอย่างเลือด ได้แก่ เลือดที่หมดอายุแล้วนาน 3, 5 และ 7 วัน ที่ให้ผลการทดสอบ DAT negative โดยใช้หมู่เลือดระบบ ABO หมู่ใดก็ได้ แต่ต้องเป็น Rh (D) positive

3.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย anti-D (IgG)

นำเลือดที่หมดอายุจากถุงเลือดใส่ลงในหลอดทดลอง ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย Normal Saline Solution (NSS) จนกว่าน้ำใสส่วนบนไม่มีสีแดง ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นทำการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยน้ำยา anti-D (IgG) ที่เตรียมแบบ serial two fold dilution ด้วย NSS ดังนี้ undiluted, 1:2, 1:4., 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 และ 1:1024 เตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง จำนวน 11 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร เติมน้ำยา anti-D (IgG) ที่เจือจางแล้ว จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองตามลำดับค่าการเจือจาง เขย่าให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย NSS เก็บน้ำส่วนบนไว้ทุกครั้ง โดยเอาส่วนบนที่ได้แต่ละครั้งมาทดสอบกับ screening cells (O1, O2 cells) จนถึงขั้นตอน antiglobulin phase จนกว่าจะได้ผลลบ จึงจะสามารถนำเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ sensitized ได้ ไปทดสอบ DAT ต่อ (การทดสอบน้ำส่วนบนกับ O1, O2 cells เพื่อทดสอบหา unsensitized antibody) โดยการใช้เลือดที่ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงเรียบร้อยแล้ว ผสมกับ NSS 2 หยด ให้น้ำเป็นสีส้มแดงเพื่อทำเป็น 3% cell suspension ใน NSS จากนั้นปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย NSS 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายสลัดน้ำเกลือทิ้งจนหมด หยดน้ำยา anti-human globulin 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่นเพื่ออ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) การควบคุมคุณภาพของ antiglobulin test

ทำโดยการหยด Coombs' Control Cells (CCC; Ig G sensitized red blood cells) 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ปั่นอ่านผลอีกครั้ง ถ้าให้ผลเป็นบวก แสดงว่าการล้างเซลล์ถูกต้องและน้ำยา antihuman globulin มีคุณภาพดี แสดงว่าผลการทดสอบถูกต้อง แต่ถ้าให้ผลเป็นลบ แสดงว่าการล้างเซลไม่ถูกต้อง หรือ ลืมหยดน้ำยา antihuman globulin หรือน้ำยา antihuman globulin ไม่มีคุณภาพ ไม่สามารถออกผลการทดสอบ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้น

จากนั้นนำเลือดที่ผ่านการ sensitization แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยใช้ alserver's solution เป็นสารรักษาสภาพเซลล์เม็ดเลือดแดง เพื่อใช้ในการติดตามผล DAT บวก ในวันเริ่มต้นของการทดสอบ (วันที่ 0) และวันที่ 1, 2 และ 3 ของการเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้เทคนิค elution

3.2 การ elution anti-D ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

การศึกษานี้ใช้เทคนิค elution 3 วิธี ได้แก่ cold-acid elution, heat elution, และ Lui freeze-thaw elution ซึ่งดำเนินการวิธีการทดลองตาม Technical Manual 16 th edition ของ American Association of Blood Bank (AABB) (Roback, Coombs, Grossman, & Hillyer, 2008) ดังนี้

3.2.1 Cold-acid elution

แช่ Glycine-HCl และน้ำเกลือ ในอ่างน้ำแข็ง เติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ในข้อ 3.1 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมน้ำเกลือเย็น 1 มิลลิลิตร เติม Glycine-HCl เย็น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ปั่นทันทีที่ 900 g นาน 2 นาที ย้ายน้ำใสส่วนบนใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด เติม phosphate buffer pH 8.2 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 900 g นาน 2 นาที ย้ายน้ำใสส่วนบนที่เรียกว่า eluate ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด นำ eluate ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 2 หยด หยด screening cells (O1, O2 cells) หลอดละ 1 หยด นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม NSS ¾ ของหลอดทดลอง ปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายซับน้ำล้างเซลล์ให้หมด หยดน้ำยา antihuman globulin 2 หยด ปั่นอ่านผลปฏิกิริยา agglutination และใช้ CCC ในการควบคุมคุณภาพของ antiglobulin test ในทำนองเดียวกับข้อ 3.1

3.2.2 Heat elution

เติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ในข้อ 3.1 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 6% bovine albumin 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยเขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา ปั่นที่ 900 g นาน 2 นาที ย้าย supernatant eluate ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด นำ eluate ทำปฏิกิริยากับ screening cells (O1, O2 cells) ในทำนองเดียวกับวิธี cold-acid elution ข้อ 3.2.1

3.2.3 Lui Freeze-Thaw elution

ผสมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ในข้อ 3.1 0.5 มิลลิลิตร และ NSS 3 หยดเขย่าให้เข้ากัน ปิดหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มให้สนิท เอียงหลอดทดลองให้สารละลายเคลือบบนผนังหลอดทดลอง เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงได้สัมผัสกับผนังหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -6 ถึง -70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยวางหลอดทดลองในแนวนอน นำหลอดทดลองออกจากตู้แช่แข็งและนำมาละลายโดยนำหลอดทดลองผ่านน้ำประปาอย่างรวดเร็ว ย้าย supernatant eluateใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ที่สะอาด นำ eluate ทำปฏิกิริยากับ screening cells (O1, O2 cells) ในทำนองเดียวกับวิธี cold-acid elution ข้อ 3.2.1

การแปลผลการทดสอบ : ถ้า DAT ให้ผลบวก แสดงว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงถูก sensitized ด้วย anti-D (IgG) และถ้า eluate ทำปฏิกิริยากับ antibody screening cells (O1, O2 cells) เมื่อเติมน้ำยา antihuman globulin (antiglobulin phase) แล้ว แสดงว่า ใน eluate มี แอนติบอดีที่แยกออกมาจากแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง

3.3 การอ่านผลและการรายงานผลการทดสอบ

การอ่านผลโดยเขย่าหลอดทดลองเบา ๆ เพื่ออ่านปฏิกิริยา agglutination ถ้าดูด้วยตาเปล่าไม่พบปฏิกิริยา ให้ดูต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ การแจกแจงปฏิกิริยาผลบวกและการให้ค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination (Roback, Coombs, Grossman, & Hillyer, 2008) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแจกแจงปฏิกิยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

เกรด	คะแนน	ลักษณะที่พบ
4+	12	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส
3+	10	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส
2+	8	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส
1+	5	เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กหลายก้อน น้ำขุ่นและมีสีแดง
W	2	เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอ มองด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะเห็นได้ชัด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำขุ่นและมีสีแดง

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS version 21.0 รายงานค่ากลางของค่าคะแนน agglutination ในรูป mean $\pm$ SD

การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการทดสอบ DAT จากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ sensitized ด้วย anti-D (IgG) ในวันเริ่มต้นของการทดสอบ (วันที่ 0) และวันที่ 1, 2 และ 3 วัน ของการเก็บเลือด ใช้สถิติทดสอบ คือ One-Way ANOVA ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ eluted anti-D (IgG) ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยใช้วิธี elution 3 วิธี ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution ในวันเริ่มต้นของการทดสอบ (วันที่ 0) และวันที่ 1, 2 และ 3 วัน ของการเก็บเลือด ใช้สถิติทดสอบ คือ One-Way ANOVA หรือ Kruskal-Wallis test ค่า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัย

4.1 การ sensitization เม็ดเลือดแดงด้วย anti-D (IgG)

จากการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงของเลือดที่หมดอายุวันที่ 3, 5 และ 7 ที่มีหมู่เลือด Rh (D) positive ด้วย anti-D (IgG) ที่ทำการเจือจาง แบบ serial two fold dilution ที่ undiluted - 1:1024 และเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ sensitization เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน จากนั้นติดตามผลด้วย DAT พบว่า เลือดที่หมดอายุเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ในวันที่ 0 ให้ผล DAT บวก ตั้งแต่ anti-D ที่ค่าความเจือจาง undiluted - 1:32 แต่เมื่อเก็บเลือดเป็นเวลา 1, 2 และ 3

วัน พบว่า ให้ผล DAT บวก ตั้งแต่ anti-D ที่ค่าความเจือจาง undiluted - 1:16 ผู้วิจัยจึงได้เปรียบเทียบค่าคะแนน agglutination ที่ anti-D ที่ค่าความเจือจาง undiluted - 1:32 พบว่าเลือดที่หมดอายุในวันเดียวกัน เมื่อเก็บเลือดที่ผ่านการ sensitization แล้ว เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน ไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutinationเ และเมื่อเปรียบเทียบเลือดที่หมดอายุเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ที่เก็บเป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination (ตารางที่ 2) แสดงว่า เลือดที่หมดอายุนานเท่ากันและไม่เท่ากัน เมื่อเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ sensitization ในเวลาเดียวกัน ไม่มีผลต่อค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการทดสอบ DAT

4.2 การ elution เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการ elution เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ที่ anti-D ค่าความเจือจาง undiluted – 1:16 พบว่าเลือดที่หมดอายุเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน เมื่อเก็บเลือดที่ผ่านการ sensitization แล้ว เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน และนำเลือดมาทำ elution 3 วิธี ไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ในวิธีเดียวกัน และไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ในแต่ละวิธี (ตารางที่ 3, 4 และ 5) แสดงว่าเลือดที่หมดอายุในเวลาเดียวกันและเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ sensitization ในเวลาเดียวกัน ไม่มีผลต่อค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการทดสอบ elution ทั้ง 3 วิธี

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination อย่างมีนัยสำคัญ ที่ได้จากวิธี elution ที่เหมือนกันของเลือดที่หมดอายุ 3, 5 และ 7 วัน และเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูก sensitized ไว้นานเท่ากัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination (ตารางที่ 6) แสดงว่าเลือดที่หมดอายุนานไม่เท่ากัน ไม่มีผลต่อการทดสอบ elution ในวิธีเดียวกัน

ตารางที่ 2 คะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก จากเลือดที่หมดอายุนาน 3, 5 และ 7 วัน

จำนวนวันที่เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก	เลือดหมดอายุ 3 วัน		เลือดหมดอายุ 5 วัน		เลือดหมดอายุ 7 วัน		ค่า p
	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	
0 วัน	7.5 ± 3.6	0.78	7.2 ± 3.1	0.73	7.2 ± 3.1	0.81	0.98
1 วัน	7.2 ± 4.2		6.0 ± 3.5		6.0 ± 3.5		0.83
2 วัน	6.0 ± 3.5		5.5 ± 3.4		5.5 ± 3.4		0.91
3 วัน	5.5 ± 3.9		5.2 ± 2.9		5.5 ± 3.4		0.98

ตารางที่ 3 คะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจากเลือดที่หมดอายุนาน 3 วัน โดยวิธี elution 3 วิธี

จำนวนวันที่เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก	Cold-acid elution		Heat elution		Lui-freeze thaw elution		ค่า p
	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	
0 วัน	7.2 ± 2.2	0.59	5.2 ± 3.3	0.56	5.6 ± 3.8	0.64	0.58
1 วัน	6.6 ± 2.3		3.6 ± 3.5		4.6 ± 3.6		0.38
2 วัน	5.6 ± 2.5		3.0 ± 3.5		3.4 ± 3.1		0.38
3 วัน	5.6 ± 2.5		2.4 ± 2.5		3.0 ± 3.5		0.21

ตารางที่ 4 คะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจากเลือดที่หมดอายุนาน 5 วัน โดยวิธี elution 3 วิธี

จำนวนวันที่เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก	Cold-acid elution		Heat elution		Lui-freeze thaw elution		ค่า p
	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	
0 วัน	7.2 ± 2.2	0.34	4.0 ± 3.1	0.53	5.0 ± 4.1	0.84	0.31
1 วัน	6.2 ± 1.6		3.0 ± 3.5		4.0 ± 3.1		0.25
2 วัน	5.6 ± 1.3		2.4 ± 2.5		3.6 ± 3.5		0.19
3 วัน	5.0 ± 2.1		1.4 ± 2.2		3.0 ± 3.5		0.13

ตารางที่ 5 คะแนนปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจากเลือดที่หมดอายุนาน 7 วัน โดยวิธี elution 3 วิธี

จำนวนวันที่เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก	Cold-acid elution		Heat elution		Lui-freeze thaw elution		ค่า p
	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	(mean ± SD)	ค่า p	
0 วัน	7.2 ± 2.2	0.83	4.2 ± 4.0	0.83	5.0 ± 4.1	0.90	0.41
1 วัน	6.6 ± 2.3		3.6 ± 3.5		4.6 ± 3.6		0.38
2 วัน	6.2 ± 1.6		3.0 ± 2.7		3.6 ± 3.5		0.17
3 วัน	6.2 ± 1.6		2.4 ± 2.5		3.6 ± 3.5		0.12

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ความแตกต่างของคะแนนปฏิกิริยา agglutination อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธี elution ที่เหมือนกันของเลือดที่หมดอายุนาน 3, 5 และ 7 วัน

จำนวนวันที่เก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก	Cold-acid elution	Heat elution	Lui-freeze thaw elution
	ค่า p	ค่า p	ค่า p
0 วัน	1.00	0.85	0.96
1 วัน	0.96	0.95	0.95
2 วัน	0.84	0.95	0.99
3 วัน	0.66	0.73	0.97

5. การอภิปรายผล

ผลจากการศึกษานี้ทำให้มีแนวทางที่จะเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวกโดยใช้ประโยชน์จากเลือดที่หมดอายุแล้วจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล ซึ่งยังไม่มีรายงานวิจัยที่จะนำเลือดที่หมดอายุมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก ทั้งนี้ผู้วิจัยได้เคยรายงานการใช้เลือดหมดอายุ หมู่เลือด A เพื่อนำมาเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงให้เป็น A subgroup หรือ weak A โดยใช้น้ำยา anti-A ที่เจือจาง เพื่อสร้างสถานการณ์ให้เป็น weak A เสมือนจริง (อังสนา, 2017) การใช้เลือดหมดอายุมีข้อดีคือผ่านการตรวจเชื้อที่ติดต่อได้ทางเลือดและให้ผลเป็นลบแล้ว ได้แก่ HIV, HBV, HCV และ syphilis ซึ่งจะไม่เป็นอันตรายต่อผู้เรียนและผู้สอน นอกจากนี้ยังมีปริมาณเลือดจำนวนมากเพียงพอที่จะให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการจริง แต่มีงานวิจัยที่รายงานว่าเมื่อเก็บเลือดที่อยู่ในถุงเลือดของงานธนาคารเลือด

นานขึ้นก็จะพบการแตกของเม็ดเลือดแดงมากขึ้น (Makroo, 2011) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการเก็บเลือดที่ยังไม่หมดอายุ แต่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บเลือดนานขึ้น การแตกของเม็ดเลือดแดงเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทางด้านการเพิ่มขึ้นของ lactate ทำให้ค่า pH ลดลง (Oyet, 2018) ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้เลือดที่หมดอายุใหม่ ๆ ประกอบกับการเดินทางที่จะต้องไปรับถุงเลือดที่หมดอายุแล้วจากโรงพยาบาล จึงได้วางแผนงานว่าจะใช้เลือดจากถุงเลือดที่หมดอายุนาน 3, 5 และ 7 วัน อย่างไรก็ตามถ้าได้เลือดที่หมดอายุใหม่ๆ ก็คาดว่าน่าจะทำให้ลดจำนวนครั้งในการเซลล์เม็ดเลือดแดงเพื่อเอา hemolysis ออกก่อนการ sensitization

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้ผลิต 3% Coombs' Control Cells (CCC) ออกจำหน่าย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของ antiglobulin test โดยมีความจำเพาะเป็น anti-D (IgG) coated Rh (D) positive cells (National Blood Centre Thai Red Cross Society, 2017) จากข้อมูลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงหาแนวทางที่จะเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก โดยการใช้ anti-D (IgG) ที่สภากาชาดไทยได้ผลิตออกจำหน่าย ซึ่งมีราคาไม่แพง โดย 10 มิลลิลิตร ราคา 200 บาท เพื่อนำมาใช้ในการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงจากเลือดที่หมดอายุที่มีหมู่เลือด Rh (D) positive

ผลจากการศึกษานี้ทำให้สามารถเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก ที่เกรดความแรงของปฏิกิริยา agglutination ต่าง ๆ ได้แก่ 4+, 3+, 2+, 1+ และ w โดย การ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจน D ด้วยน้ำยา anti-D (IgG) ตามค่าความเจือจางของ anti-D จากเจือจางน้อยไปถึงเจือจางมาก เป็นการจำลองสถานการณ์ในกรณีที่ผู้ป่วยให้ผล DAT บวกในเกรดของปฏิกิริยา agglutination ต่าง ๆ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า anti-D ที่ทำให้ผล DAT บวก ที่ค่าความเจือจางสุดท้ายคือ 1:32 ซึ่งให้ผลเกรดปฏิกิริยา agglutination เป็น w ทั้งนี้เลือดที่หมดอายุต่างกัน ได้แก่ 3, 5 และ 7 วัน เมื่อเก็บเลือดที่ผ่านการ sensitization เป็นเวลาเดียวกัน ได้แก่ วันที่ 0, 1, 2 และ 3 วัน ให้ผลค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการเก็บที่เวลาน้อยกว่าให้ค่าเฉลี่ยของค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination มากกว่า

เทคนิคการ elution เพื่อทำให้แอนติบอดีซึ่งทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนเซลล์เม็ดเลือดแดงแล้วหลุดออกมา ซึ่งสามารถทำได้ด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น ใช้ความร้อน (heat) คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) การแช่แข็งหรือการละลาย (freeze and thaw) หรือวิธีทางเคมี เช่น การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง การใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง หรือการสารใช้เคมีต่างๆ เช่น chloroform, ether, xylene หรือ chloroquine diphosphate ทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน (Robert, 2006) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้ elution 3 วิธี ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution เพื่อเป็นแนวทางให้นักศึกษาได้ฝึกปฏิบัติการจริง เนื่องจากสามารถหาสารเคมี น้ำยาที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป รวมทั้งสามารถจัดเตรียมอุปกรณ์และน้ำยาเพื่อใช้ในการเรียนการสอนให้แก่นักศึกษาได้อย่างง่ายดาย สะดวก และปลอดภัยต่อผู้สอนและผู้เรียน

เมื่อเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผ่านการ sensitization แล้ว นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน ให้ผล DAT บวก ที่ anti-D ค่าความเจือจาง undiluted – 1:16 ผู้วิจัยจึงทำการติดตามเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก โดยการ elute เอา ani-D ออกจากเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าวิธี cold-acid elution, heat elution และ Lui-freeze thaw elution ให้ผลค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามวิธี cold-acid elution ให้ค่าเฉลี่ยของค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination มากกว่า

การศึกษานี้มีขอบเขตที่ใช้เลือดหมดอายุที่เก่าที่สุดคือ 7 วัน แต่ทั้งนี้ก็ยังได้ผลการทดสอบทั้ง DAT และ elution ที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งถ้าได้เลือดหมดอายุที่ใหม่กว่างานวิจัยนี้ ก็จะช่วยลดขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงเพื่อเอา hemolysis ออก ก่อนการ senstitization ได้ นอกจากนี้ผลจากการงานวิจัยยังบ่งบอกว่าสามารถเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ sensitized แล้วได้นาน 3 วัน โดยที่ให้ผล DAT และ elution ในวิธีเดียวกันและต่างวิธีที่ไม่แตกต่างกัน

6. บทสรุป

ผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผล DAT บวก โดยใช้ประโยชน์จากถุงเลือดที่หมดอายุแล้วจากธนาคารเลือดของโรงพยาบาล เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการของวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยสามารถ sensitize เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็น Rh (D) positive ด้วย anti-D (IgG) ที่ค่าความเจือจางของน้ำยาต่าง ๆ กัน ทำให้ได้ผล DAT บวก ที่เกรดของ agglutination ต่าง ๆ กัน และสามารถเก็บเซลล์เม็ดเลือดแดงได้นาน 3 วัน และการติดตามผลเซลเม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคของ elution ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ cold-acid elution, heat elution และ Lui freeze-thaw elution ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสามารถใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่หาได้ง่ายและปลอดภัย ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวอุทัยภรณ์ มานาง ที่ให้การช่วยเหลือในการวิจัยนี้

8. เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ โล่ห์เลขา. (2535). โรคติดเชื้อไวรัสจากการให้เลือด. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*, 2(1), 7-10.

อังสนา โยธินารักษ์, และอรนันท์ พรหมมาโน. (2017). การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงและน้ำยา anti-A เสมือนจริง เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่องการยืนยัน Weak A โดยวิธี Adsorption และ Elution ในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 2. *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2560 (RSU National Research Conference 2017)*, 28 เมษายน 2560 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี, 1276 - 1288.

Leger, R.M. (2008). *Technical manual* (16th ed.). Bethesda, Maryland United States: AABB.

Makroo, R.N., Raina, V., Bhatia, A., Gupta, R., Majid, A., & Thakur, U.K. (2011). Evaluation of the red cell Hemolysis in packed red cells during processing and storage. *Asian J Transfus Sci*, 5(1), 15-17.

National Blood Centre Thai Red Cross Society. (2017). Certificate of analysis of 3% Coombs' Control Cells.

Oyet, C., Okongo, B., Onyuthi, R.A., & Muwanguzi, E. (2018). Biochemical changes in stored donor units : implications on the efficacy of blood transfusion. *J Blood Med,* 9, 111-115.

Roback, J.D., Coombs, M.R., Grossman, B.J., & Hillyer, C.D. (2008). *Technical manual* (16th ed.). Bethesda, Maryland United States: AABB.

Robert, G.H. (2006). *Continuing education topics and issues*. Retrieved from http://www.americanmedtech.org/files/step_online_articles/301.pdf