# การเตรียมและศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาซีรั่มเสมือนจริง สำหรับการตรวจกรองแอนติบอดีโดยวิธีหลอดทดลองและวิธีคอลัมน์แอกกลูติเนชั่น-

# Preparation and storage stability of virtual serum for antibody screening by conventional tube test and column agglutination test

อังสนา โยธินารักษ์[1] และ จิราภรณ์ เกตุดี[1*]
Aungsana Yothinarak[1] and Jiraporn Gatedee[1*]

**Received**: 29 May 2024 ; **Revised**: 26 August 2024 ; **Accepte**d: 18 September 2024

## บทคัดย่อ

การเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิตของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เรื่อง การตรวจกรองแอนติบอดี ต้องมีการเตรียมสิ่งตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นลบและบวก แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้เลือดจากผู้ป่วยในปริมาณมากเพื่อนำมาปั่นแยกซีรั่มออกมา จึงจะเพียงพอต่อนักศึกษาที่จะปฏิบัติจริง ซึ่งซีรั่มเป็นสิ่งตัวอย่างที่อาจเสี่ยงต่อโรคติดต่อ ได้แก่ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซีและเชื้อไวรัสเอชไอวี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมและศึกษาความคงตัวของซีรั่มเสมือนจริง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 และ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการตรวจกรองแอนติบอดี การเตรียมซีรั่มเสมือนจริงที่ให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นลบและบวก ทำโดยนำผงเก๊กฮวย โซเดียมคลอไรด์ อัลบูมิน ละลายในน้ำกลั่น เติมสีน้ำสีเหลืองไข่ ผสมจนสารละลายละลายเข้ากัน จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่ากัน และเติม anti-D (IgG) ที่อัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1: 8 เพื่อทำเป็นซีรั่มเสมือนจริงแบบให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นบวก ส่วนซีรั่มเสมือนจริงแบบให้ผลการตรวจกรองแอนติบอดีเป็นลบจะไม่เติม anti-D (IgG) แบ่งใส่หลอดทดลอง เพื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 และ -20 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และตรวจกรองแอนติบอดี ด้วยวิธีหลอดทดลองและวิธีคอลัมน์แอกกลูติเนชั่น ทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 27 วัน (วันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 27) โดยทำการเปรียบเทียบผลการตรวจกรองแอนติบอดีกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) ผลการทดลองพบว่าซีรั่มเสมือนจริง ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีความคงตัวของลักษณะทางกายภาพดีกว่าเก็บที่ 2 - 8 องศาเซลเซียส และการเก็บทั้งสองอุณหภูมิให้ผลการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธีหลอดทดลองและวิธีคอลัมน์แอกกลูติเนชั่นเป็นลบและบวกจริงในทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ผลจากงานวิจัยนี้น่าจะเป็นแนวทางในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริง ที่ปลอดภัย ไม่เสี่ยงต่อโรคติดต่อ เพื่อใช้สำหรับการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ เรื่อง การตรวจกรองแอนติบอดี

**คำสำคัญ**: ซีรั่มเสมือนจริง, แช่เย็น, แช่แข็ง, การตรวจกรองแอนติบอดี, ความคงตัว

## Abstract

This article is a study on the topic of the antibody screening requirements when preparing negative and positive samples for testing at the transfusion science laboratory at the Faculty of Medical Technology, Rangsit University. However, there is a limitation with regard to the need for a large quantity of patient blood samples in order to separate serum, so that there is sufficient for the students to use in their practices. In addition, serum samples have the risk of infectious diseases, such as hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. The purpose of this research is to examine the stability of virtual serum stored at temperatures of 2 - 8 and -20 $^{O}$C for antibody screening. Preparing a virtual serum for both negative and positive antibody screening is conducted by using chrysanthemum powder, sodium chloride, albumin, and dissolving them in distilled water, then adding yellow coloring and finally mixing until the solution is well blended. Next, the serum is divided into two equal parts and anti-D (IgG) is added to the virtual serum at a dilution ratio of 1:8 to obtain a positive result, while the virtual serum that gives a negative result

[1] คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
[1] Faculty of Medical Technology, Rangsit University
* Corresponding author: E-mail: jiraporn.g@rsu.ac.th

will not have any anti-D (IgG). The virtual serum was then aliquoted for storage at 2 - 8 °C and -20 °C. The physical examination, antibody screening using a conventional tube test (CTT) and a column agglutination test (CAT) were assayed every 3 days for 27 days (day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, and 27) and then the results were compared with the baseline (day 0). The results showed that virtual serum stored at -20 $^{O}$C had a greater physical stability than when it was stored at 2 - 8 $^{O}$C. The storage of virtual serum at both temperatures gave true negative and true positive results for antibody screening with CAT and CTT on the day of the testing. This study may provide a way of preparing virtual serum for antibody screening that is safe, non-infectious, and suitable for students' laboratory practice.

**Keywords**: Virtual Serum, refrigerate, frozen, antibody screening, stability

## บทนำ

การเรียนการสอนในภาคปฏิบัติการ วิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต มีหัวข้อเรื่อง antibody screening ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อตรวจหา unexpected antibodies ที่มีความสำคัญทางด้านคลินิก โดยทำในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ ผู้บริจาคโลหิต ผู้ป่วยที่จะรับเลือด ผู้ป่วยที่เกิดปฏิกิริยาอันไม่พึงประสงค์จากการรับเลือด หญิงมีครรภ์ที่มีประวัติว่าเคยมีบุตรตาเหลือง ตัวเหลือง มีประวัติการแท้ง หรือได้รับเลือดมาก่อนตั้งครรภ์แล้วหลายครั้ง (Tholpady, 2016; ภาวิณี คุปตวินทุ และคณะ, 2553) การทดสอบดังกล่าวต้องมีการใช้สิ่งตัวอย่างชนิดซีรั่ม ซึ่งการเตรียมสิ่งตัวอย่างชนิดซีรั่มเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เลือดครบส่วนปริมาณมากเพื่อนำมาปั่นแยกซีรั่มออกมา จึงจะเพียงพอต่อนักศึกษาชั้นปีที่ 3 จำนวน 200 คน ทั้งนี้การเจาะเลือดจากมนุษย์ในปริมาณมากไม่สามารถทำได้ เพราะอาจเป็นอันตรายต่อผู้ถูกเจาะ นอกจากนี้ unexpected antibodies ในบางกลุ่มประชากรพบได้น้อย โดยมีการพบได้ร้อยละ 0.3 - 38.0 การพบร้อยละที่แตกต่างกันนั้นขึ้นกับกลุ่มประชากรและวิธีการทดสอบที่ใช้ (Roback, 2008) และซีรั่มยังเป็นสิ่งตัวอย่างที่อาจเสี่ยงต่อโรคติดต่อจากการรับเลือด ได้แก่ เชื้อตับอักเสบบี ซีและเชื้อเอดส์ (HBV, HCV, HIV) (ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา, 2548) ซึ่งมีอันตรายต่อนักศึกษาที่ทำการฝึกตรวจ antibody screening

ปี 2560, 2561, 2564 มีการวิจัยเพื่อพัฒนาการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibodies เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ วิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต โดยเป็นการเตรียมสารละลายให้เป็นซีรั่มเสมือนจริง ที่ไม่ยุ่งยาก หาซื้อสารและน้ำยาได้ง่าย ราคาไม่แพง และนำมาทำเป็นสิ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็นลบและบวกในการทดสอบ antibody screening ผลที่ได้ทำให้ผู้สอนมีทางเลือกที่จะเตรียมสารละลายซีรั่มเสมือนจริงเพื่อทดแทนการใช้ pooled serum หรือ frozen plasma ที่ได้จากมนุษย์ อย่างไรก็ตาม หากมีการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงสำหรับใช้ในการเรียนการสอนเรื่อง antibody screening ในปริมาณมาก และสามารถเก็บรักษาไว้ได้ โดยคุณลักษณะของซีรั่มเสมือนจริง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกาย ภาพของซีรั่มเสมือนจริงและติดตามผลของ antibody screening ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกโดย conventional tube test (CTT) และ column agglutination technique (CAT) เมื่อเก็บซีรั่มเสมือนจริงที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน

## วิธีการดำเนินการวิจัย

**1. การเตรียมซีรั่มเสมือนจริง**

**1.1 การเตรียมซีรั่มเสมือนจริงแบบให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นลบ ดังนี้**

ชั่งผงเก๊กฮวย 36 กรัม, NaCl 5.1 กรัม อัลบูมิน 0.6 กรัม และละลายสารในน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร เติมสีน้ำสีเหลืองไข่ 900 ไมโครลิตร ผสมจนสารละลายละลายเข้ากัน รายงานลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่าทางด้านสี ความขุ่น การเกิดก้อนหรือเจล และตรวจสอบแบคทีเรียและเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT และตรวจสอบผลการทดลองว่าให้ผลเป็นลบทุกสถานะของการทดสอบ (RT, 37 องศาเซลเซียส และ antiglobulin phase) แบ่งใส่หลอดทดลอง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

**1.2 การเตรียมซีรั่มเสมือนจริงแบบให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นบวก ดังนี้**

เตรียมซีรั่มเสมือนจริง ทำนองเดียวกับข้อ 1.1 และเติม anti-D (IgG) ที่อัตราส่วนการเจือจางเท่ากับ 1: 8 ด้วยซีรั่มเสมือนจริง ผสมจนสารละลายเข้ากัน รายงานลักษณะทางกายภาพ ด้านสี ความขุ่นการเกิดก้อนหรือเจล และตรวจสอบแบคทีเรียและเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT

และตรวจสอบผลการทดลองว่าให้ผลเป็นบวกที่ antiglobulin phase แบ่งใส่หลอดทดลอง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

**1.3 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ**

จากซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นในข้อ 1.1 และ 1.2 นำมาทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า ได้แก่ การตรวจสอบสี ความขุ่น และตรวจสอบแบคทีเรียและเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (objective len 40X) ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 27 วัน (วันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 27) โดยผู้วิจัย 2 คนและทำการเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0)

**2. การทดสอบ antibody screening**

**2.1 วิธี conventional tube test (CTT)**

ซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นในข้อ 1.1 และ 1.2 ที่ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส โดยซีรั่มเสมือนจริงที่เก็บที่- 20 องศาเซลเซียส ได้นำมาละลายภายใต้น้ำที่ไหลอย่างต่อเนื่อง จากนั้นนำมาปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที ก่อน ทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT (ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรั่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, 2567) ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 27 วัน (วันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 27) โดยแต่ละวันที่ทดสอบ จะทำ antibody screening แบบซ้ำสามครั้ง (triplicate) และทำการเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) ดังนี้ เตรียมหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มม. จำนวน 2 หลอด เขียนกำกับแต่ละหลอดเป็น O1 และ O2 เติมซีรั่มเสมือนจริง 2 หยด ลงในแต่ละหลอด หยด screening cells O1 และ O2 ให้ตรงกับที่เขียนกำกับข้างหลอด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ปั่นอ่านผล 20 วินาที โดยดูปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) บันทึกผลที่อุณหภูมิห้อง (RT) อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นอ่านผล 20 วินาที โดยดูปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) จากนั้นให้เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ( agglutination) บันทึกผลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย normal saline solution (NSS) จำนวน 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายสลัด NSS ออกจนหมด หยด anti-human globulin reagent 2 หยด เขย่าให้เซลล์เม็ดเลือดแดงผสมกับน้ำยา ปั่นอ่านผล 20 วินาที เขย่าหลอดทดลองเพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) ด้วยตาเปล่า ถ้าไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) ให้ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลที่ indirect antiglobulin test (IAT)

การควบคุมคุณภาพของ antiglobulin test: หยด Coombs' Control Cells (CCC) 1 หยด ลงในหลอดที่ให้ผลของการทดสอบเป็นลบ ปั่นอ่านผลอีกครั้ง ถ้าให้ผลบวก คือ มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง(agglutination) แสดงว่าขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงถูกต้อง น้ำยา anti-human globulin มีคุณภาพดี ออกผลการทดสอบที่ IAT ว่า เป็นลบจริง แต่ถ้าให้ผลลบ คือ ไม่มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แสดงว่าขั้นตอนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ถูกต้อง หรือน้ำยา anti-human globulin ไม่มีคุณภาพ ต้องทำการทดสอบใหม่ตั้งแต่ต้น

**การอ่านผลการทดสอบ**

การอ่านผลปฏิกิริยาการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) มีรายละเอียด ดังนี้

PH มีการแตกสลายขอเม็ดเลือดแดงบางส่วน (partial hemolysis) น้ำเป็นสีแดง มี เซลล์ เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ที่ก้นหลอดทดลอง

H มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (complete hemolysis) น้ำเป็นสีแดง ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงเหลืออยู่ที่ก้นหลอดทดลอง

การอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) มีรายละเอียด ดังนี้

4+ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส

3+ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส

2+ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส

1+ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กหลายก้อน น้ำขุ่นและมีสีแดง

W เม็ดเลือดแดงกระจายตัวสม่ำเสมอมองด้วยตาเปล่าเกือบไม่เห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง จะเห็นได้ชัดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ น้ำขุ่นและมีสีแดง

0 ไม่พบการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง น้ำขุ่นเป็นเนื้อเดียวกันและมีสีแดง

**2.2 วิธี column agglutination technique (CAT)**

ซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นในข้อ 1.1 และ 1.2 ที่ทำการเก็บอุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส โดยซีรั่มเสมือนจริงที่เก็บที่- 20 องศาเซลเซียส ได้นำมาละลายภายใต้น้ำที่ไหลอย่างต่อเนื่อง จากนั้น นำมาปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที ก่อนทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CAT (Raos *et al.*, 2018) ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 27 วัน (วันที่ 0,

3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 และ 27) และทำการเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) ดังนี้ หยด 50 µl ของ 1% O1 และ O2 ลงใน microcolumn AHG และหยดซีรั่มเสมือนจริงลงในแต่ละ microcolumn หลอดละ 25 µl อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นนาน 5 นาที อ่านผล และบันทึกผลการทดลอง

**การอ่านผลการทดสอบ**

ระดับความแรงของปฏิกิริยาจับกลุ่มในวิธี CAT สามารถอ่านผลได้เป็น 4+, 3+, 2+, 1+ และ negative ดังแสดงใน Figure 1

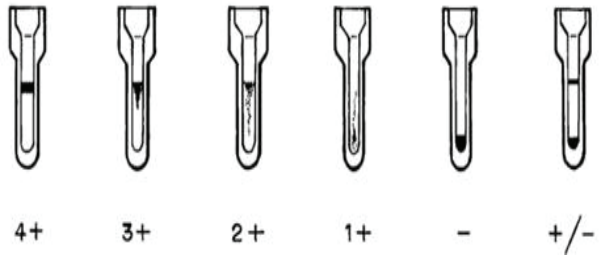


**Figure 1** Reading the results of antibody screening by column agglutination technology

## ผลการทดลอง

ผลการทดสอบลักษณะทางกายภาพของซีรั่มเสมือนจริงที่ให้ผล antibody screening เป็นลบและบวก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน โดยมีการศึกษา สี ความขุ่น และอนุภาคที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกๆ 3 วันเป็นเวลา 27 วัน พบว่าซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นในวันแรก มีลักษณะทางกายภาพคือ มีสีเหลือง ขุ่นเล็กน้อย (Figure 2) และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาโดยมีลักษณะทางกายภาพเหมือนวันเริ่มต้นได้ 6 วัน จากนั้นตั้งแต่วันที่ 9 ถึง 27 ลักษณะทางกายภาพจะเริ่มเปลี่ยนเป็น สีเหลืองเข้ม ขุ่น และมีตะกอน โดยตะกอนจะพบมากในวันที่ 12 - 27 ของการเก็บการรักษา (Table 1) ในขณะที่ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีลักษณะทางกายภาพ สีเหลือง ขุ่นเล็กน้อยตั้งแต่วันที่เริ่มต้นจนครบเวลา 27 วัน

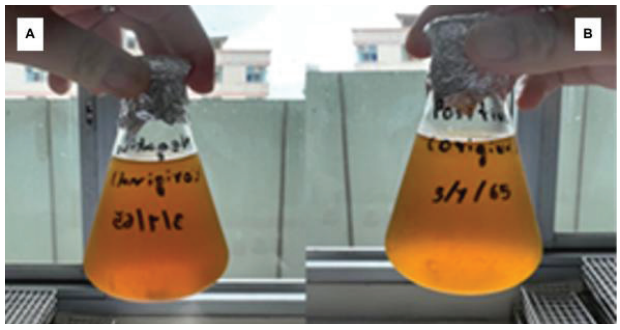


**Figure 2** The negative (A) and positive (B) virtual serum for antibody screening at day 0

ผลการทดสอบ antibody screening ของซีรั่มเสมือนจริง เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน พบว่าซีรั่มเสมือนจริงที่ไม่เติม anti-D (IgG) และทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และวิธี CAT ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน โดยให้ผลลบทั้ง 3 ครั้ง (triplicate) ที่สถานะ RT, 37 °C และ IAT (ไม่แสดงผลการทดลอง) สำหรับซีรั่มเสมือนจริงที่เติม anti-D (IgG) และทำการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT ให้ผลการทดสอบบวกที่สถานะ IAT (Figure 3 และ Table 2) และด้วยวิธี CAT ให้ผลการทดสอบบวก (Figure 4 และ Table 3) ตั้งแต่วันที่เริ่มต้นจนครบเวลา 27 วัน

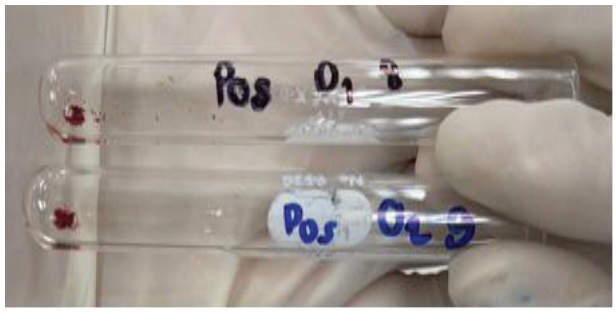


**Figure 3** The positive results of antibody screening at IAT phase by conventional tube test

**Table 1** Physical examination of virtual serum after storage at 2 - 8 ºC and -20 ºC for 27 days

| Day (s) | Physical examination | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 - 8 ºC | | -20 ºC | |
| | Negative (without anti-D (IgG)) | Positive (with anti-D (IgG)) | Negative (without anti-D (IgG)) | Positive (with anti-D (IgG)) |
| Day 0 | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 3 | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 6 | dark yellow, turbid, bacteria few | dark yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 9 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 12 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 15 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 18 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 21 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 24 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |
| Day 27 | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | dark yellow, turbid with sediment, bacteria few, pseudohyphae few | yellow, turbid, bacteria few | yellow, turbid, bacteria few |

**Table 2** Results of antibody screening by CTT using positive virtual serum stored at 2 - 8 ºC and -20 ºC

| Day (s) | Positive virtual serum stored at 2 - 8 ºC | | | | | | | | Positive virtual serum stored at -20 ºC | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | O1 | | | | O2 | | | | O1 | | | | O2 | | | |
| | RT | 37 °C | IAT | CCC | RT | 37 °C | IAT | CCC | RT | 37 °C | IAT | CCC | RT | 37 °C | IAT | CCC |
| Day 0 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 3 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 6 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 9 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 12 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 15 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 18 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 21 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 24 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |
| Day 27 | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND | 0 | 0 | 3+ | ND |

ND = Not done

**Table 3** Results of antibody screening by CAT using positive virtual serum stored at 2 - 8 ºC and -20 ºC

| Day (s) | Positive virtual serum stored at 2 - 8 ºC | | | | | | Positive virtual serum stored at -20 ºC | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | O1 | | | O2 | | | O1 | | | O2 | | |
| | 37 °C | | | 37 °C | | | 37 °C | | | 37 °C | | |
| | 1st | 2nd | 3rd | 1st | 2nd | 3rd | 1st | 2nd | 3rd | 1st | 2nd | 3rd |
| Day 0 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 3 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 6 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 9 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 12 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 15 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 18 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 21 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 24 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| Day 27 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |

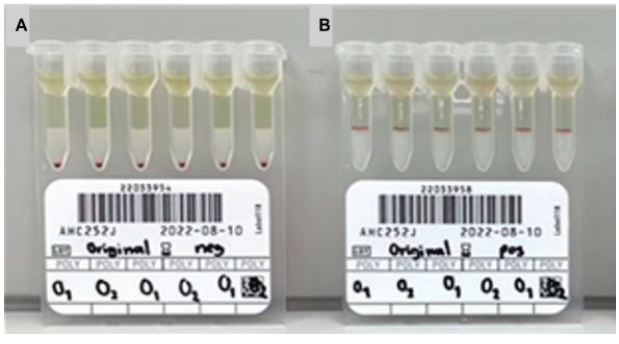


**Figure 4** The negative results (A) and positive results (B) of antibody screening by column agglutination test

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มีการศึกษาเบื้องต้นในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ วิชา วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต 1 ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต เรื่อง antibody screening (อังสนา โยธินารักษ์ และอรนันท์ พรหมมาโน, 2560) และได้มีการพัฒนาการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงเพื่อให้ผลการทดสอบ antibody screening ไม่พบผลบวกปลอมจากการที่เม็ดเลือดแดงของ screening cells แตกจากสารละลายของซีรั่มเสมือนจริง โดยการเติมอัลบูมินลงในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริง (อังสนา โยธินารักษ์, 2561) ซึ่งต่อมาได้มีการลดปริมาณของอัลบูมิน เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย (ณภาภัช แสงทวีป และคณะ, 2564) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาการเก็บซีรั่มเสมือนจริง เพื่อไว้ใช้ในการเรียนการสอนดังกล่าว การศึกษานี้จึงเก็บซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นจากการพัฒนาที่ผ่านมา และเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส การศึกษานี้ มีการเตรียมซีรั่มเสมือนจริง จำนวน 600 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการเตรียมครั้งเดียว จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่เป็น 2 ส่วนๆ ละเท่ากัน ดังนี้ 1) ส่วนที่ 1 จำนวน 300 มิลลิลิตร ถ้าเป็นแบบให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นลบ จะไม่มีการเติม anti-D (IgG) จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่เป็น 2 ส่วนๆ ละ 150 มิลลิลิตร ถ้าเป็นการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส จะเก็บทั้งขวดรูปชมพู่ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะแบ่งใส่หลอดทดลองๆ ละ 12 มิลลิลิตร ได้จำนวน 12 หลอด เพื่อจะนำมาละลายและตรวจสอบทุกๆ 3 วัน จนครบวันที่ 27 2) ส่วนที่ 2 จำนวน 300 มิลลิลิตร ถ้าเป็นแบบให้ผลการทดสอบ antibody screening เป็นบวก จะมีการเติม anti-D (IgG) ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:8 เพื่อให้ได้ผลการทดสอบ antibody screening 3+ - 4+ จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่เป็น 2 ส่วนๆ ละ 150 มิลลิลิตร ถ้าเป็นการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส จะเก็บทั้งขวดรูปชมพู่ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะแบ่งใส่หลอดทดลองๆ ละ 12 มิลลิลิตร ได้จำนวน 12 หลอด เพื่อจะนำมาละลายและตรวจสอบทุกๆ 3 วัน จนครบวันที่ 27 การศึกษานี้ จึงมีขวดรูปชมพู่ทั้งหมด จำนวน 4 ขวด ซึ่งผู้วิจัยได้ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของทั้ง 4 ขวด ด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งลักษณะควรได้เหมือนกัน หรือใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ผลจาก Table 1 ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 27 พบว่าซีรั่มเสมือนจริงที่เตรียมขึ้นทั้งแบบที่ให้ผล antibody screening เป็นลบ

และบวก (เติม anti-D (IgG) พบแบคทีเรียจำนวนเล็กน้อย (1-10/HPF) อาจเป็นเพราะอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริง มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีผลกับการเก็บรักษาซีรั่มเสมือนจริงที่ 2-8 º ซึ่งแบคทีเรียและเชื้อราอาจเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้ ดังนั้นหากต้องการเก็บรักษาซีรั่มเสมือนจริงให้นานขึ้น ควรมีการนึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ก่อนใช้งาน อย่างไรก็ตามแบคทีเรียและเชื้อราที่พบไม่มีผลต่อการทดสอบ antibody screening เมื่อทดสอบด้วยวิธี CTT และ CAT ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 27 วัน

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเก็บซีรั่มเสมือนจริง ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส ลักษณะทางกายภาพของซีรั่มเสมือนจริงในวันที่ 6 เริ่มมีสีเหลืองเข้มขึ้น และสีเหลืองเข้มนี้คงอยู่ตลอดไปจนถึงวันที่ 27 ส่วนตะกอนเริ่มมีขึ้นในวันที่ 9 และมีตะกอนมากขึ้นตั้งแต่วันที่ 12 จนถึงวันที่ 27 ที่เก็บซีรั่มเสมือนจริง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงมีการจับกันจนเกิดเป็นตะกอนในที่เย็น ในขณะที่การเก็บซีรั่มเสมือนจริง ที่อุณหภูมิ -20 องศาสเซลเซียส พบว่าลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงวันที่ 27 แสดงว่าการเก็บแช่แข็ง ช่วยทำให้สารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริงมีความคงตัว ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารที่ใช้ในการเตรียมซีรั่มเสมือนจริง

อย่างไรก็ตามการทดสอบ antibody screening ด้วยวิธี CTT และ CAT ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกจริง ตลอดระยะเวลาที่ศึกษานาน 27 วัน โดยไม่เกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอม แสดงว่าการเก็บซีรั่มเสมือนจริงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมมากกว่าการเก็บซีรั่มเสมือนจริงที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส

สรุป การเก็บซีรั่มเสมือนจริง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำให้มีลักษณะทางกายภาพไม่เปลี่ยนแปลงจากวันเริ่มต้น และสามารถเก็บได้นาน 27 วัน โดยไม่เกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอมในการทดสอบ antibody screening

## ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพิ่มเติม ควรทำการศึกษาความแรงของปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในระดับ 1+ - 2+ เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่ชัดเจนกว่า หากคุณสมบัติของซีรั่มเสมือนจริงในการตรวจ antibody screening มีการเปลี่ยนแปลง ไป ซึ่งจะชัดเจนกว่าการศึกษาโดยใช้ความแรงของปฏิกิริยาระดับ 3+ - 4+ เพียงอย่างเดียว

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท Ortho Clinical Diagnostics (THAILAND) ที่ ให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการทดสอบโดยวิธี column agglutination technique (CAT)

## เอกสารอ้างอิง

ณภาภัช แสงทวีป, นูรอาฟีฟะร์ แซแมง, ปรีญาภัทร เม่งบุตร, วัชรินทร์ จันผือโป๊ด, สุกฤตา พลอยมีค่า และอณิศรา อินทะชิน. (2564). *การตรวจสอบซีรั่มเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง Unexpected Antibody ที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบและบวกโดย Conventional Tube Test และ Column Agglutination Technique*. (ภาคนิพนธ์ปริญญาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยรังสิต, ปทุมธานี.

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรั่มและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. (2567). *3 % screening cells*. กรุงเทพฯ: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย.

ภาวิณี คุปตวินทุ, มรกต เอมทิพย์ และ ดวงพร สังข์นุ่น. (2553). แอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดต่าง ๆ ใน ผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการ โลหิต, 20*(4), 255-262.

ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยธยา. (2548). อิศรางกูร ณ อยธยา, ภ. (2548). *ภาวะแทรกซ้อนจากการรับเลือด เชื้อตับอักเสบบี ซี และเชื้อเอดส์ (HBV, HCV, HIV)*. สืบค้นจาก http://www.thalassemia.or.th/disease_trans.html

อังสนา โยธินารักษ์ และอรนันท์ พรหมมาโน. (2560). *การศึกษาเบื้องต้นเพื่อเตรียมซีรั่มเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibody* [เอกสารประกอบการประชุม]. การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 5, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย.

อังสนา โยธินารักษ์. (2561). *การเตรียมซีรั่มเสมือนจริงสำหรับการตรวจกรอง unexpected antibody* [Preparation of simulated serum for unexpected antibody screening] [เอกสารนำเสนอ]. การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 6, สมุทรปราการ, ประเทศไทย.

Raos, M., Novoselac, J., Burnac, I.L., Lukic, M., Leskovar, I., & Cepulic, B.G. (2018). Evaluation of antibody screening and identification pre-transfusion tests using DG

Roback, J.D., Combs, M.R., Grossman, B.J., Hillyer, C.D. (2008). Technical Manual 16th ed. Bethesda, American Association of Blood Banks.

Tholpady, A. & Bai, Y. (2016). Antibody screening. Retrieved from http://emedicine.medscape.com/article/1731232-overview.