การพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

นางสาววิภาดา ชนาเกียรติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Development of red blood cell antigen phenotyping profile test by paper-based analytical devices

Miss Wipada Chanakiat

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clincal Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ
โดย	นางสาววิภาดา ชนาเกียรติ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาลนี อัมรานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุนทรี กุลกีรติยุต)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.เชิดชาย แซ่ฮ่วน)

วิภาดา ชนาเกียรติ : การพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (Development of red blood cell antigen phenotyping profile test by paper-based analytical devices) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช, 93 หน้า.

ปัจจุบันการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงจะทำโดยวิธีหลอดทดลอง วิธีไมโครเพลท และวิธีคอลัมน์ ซึ่งมีต้นทุนสูง ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์เฉพาะ ใช้เวลานานและไม่สะดวกต่อการเก็บผลการทดสอบ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบนกระดาษ สำหรับตรวจแอนติเจน D, K, C, E, c, e, Jk^a, Jk^b และ P_1 โดยเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกันกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษจะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในบริเวณทดสอบ เม็ดเลือดแดงที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกันจะไม่จับกลุ่มและถูกชะให้ไหลออกไปในท่อด้วย phosphate buffer saline อ่านผลการทดสอบที่จุดสิ้นสุดปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าและตรวจยืนยันผลด้วยการวัดความเข้มแสงเฉลี่ยของภาพด้วยโปรแกรม Image J เมื่อทดสอบกับตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ รวม 50 ตัวอย่าง ผลการทดสอบมีความถูกต้อง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง โดยสรุปวิธีการที่นำเสนอนี้ เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ รวดเร็ว ทำได้ง่าย อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า สามารถตรวจตัวอย่างเลือดปริมาณมากได้พร้อมกัน ทำลายง่าย และเป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดในระบบอื่นๆ เช่น MNS หรือ Duffy เป็นต้น ทั้งยังมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา	เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก	ลายมือชื่อนิสิต .....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....
ปีการศึกษา	2558	

5576662937 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: BLOOD GROUP ANTIGENS PHENOTYPING / HEMAGGLUTINATION / RBC AG-TYPING PROFILE PADS

WIPADA CHANAKIAT: Development of red blood cell antigen phenotyping profile test by paper-based analytical devices. ADVISOR: ASST. PROF. DR. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, CO-ADVISOR: TASANEE SAKULDAMRONGPANICH, 93 pp.

Currently, the methods for blood group antigens phenotyping are the standard tube, microplate and column agglutination methods. Nevertheless, the methods are expensive and required complicated and time-consuming processes. In this study, we developed a paper-based analytical device for red cell antigens typing (RBC Ag-typing profile PADs) of antigen D, K, C, E, c, e, Jk^a, Jk^b and P_1. The principle of the device is based on the present or absent of hemagglutination at the PADs detection zone where the antibody was pre-immobilized. The antigen positive RBCs react and agglutinate with their corresponding antibodies while the antigen negative RBCs fail to agglutinate and were eluted by phosphate buffer saline. The agglutinated or non-agglutinated RBC results can be visually read. The correctly results of RBC Ag-typing profile PADs for donor blood samples and panel cells (n = 50) were 100%, in comparison with standard tube method. The RBC Ag-typing profile PADs developed in this study is low cost, fast, easy to use, high throughput, economical and could be further developed for additional phenotyping of blood group systems such as MNS, Duffy etc. In addition, this method has a potential to be adapted to a large scale production and could be of great benefit to all blood banking laboratories.

Department: Transfusion Medicine and Clincal Microbiology Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Field of Study: Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology Co-Advisor's Signature .....
Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อ.ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งเป็นผู้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาและข้อผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นตลอดจนติดตามความก้าวหน้าในการทำวิจัย ทั้งยังให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในทุกๆ ด้านจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลนี อัมรานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อ.ดร.สุนทรี กุลกีรติยุต กรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ อ.ดร.เชิดชาย แซ่ฮ่วน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก ที่คอยสั่งสอน ให้ความรู้และให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่และอุปกรณ์ในการทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์บริการวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้โครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558 (รหัสโครงการ WCU-58-002-HR) และทุนผู้ช่วยสอนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้อนุญาตให้เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิต และขอขอบคุณบุคลากรหน่วยงานธนาคารเลือดที่อำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ สำหรับทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง นิสิตบัณฑิตศึกษาคณะสหเวชศาสตร์ โดยเฉพาะนางสาวจุฬาลักษณ์ น้อยพ่วง นางสาวเต็มศิริ ทรงเจริญ นางสาวณัฐชา หล้าพันธ์ และนางสาวอัญชลี ประสารสุขลาภ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยมาโดยตลอด และสุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้ทุกสิ่งทุกอย่างกับผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 5

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 5

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

2.1 การให้เลือด (blood transfusion) และการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing) 7

2.1.1 การให้เลือด (blood transfusion) 7

2.1.2 กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing) 7

2.2 แอนติเจนของหมู่เลือด (Blood group antigens) 13

2.2.1 Rh blood group system [ISBT004] 14

2.2.2 Kidd blood group system [ISBT 009] 17

2.2.3 Kell blood group system [ISBT 006] 18

2.2.4 P1PK blood group system [SBT003] 19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.3 แอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือด (Blood Group Antibodies) 20
2.4 วิธีการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (Red blood cell Ag-typing test) ทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด 25
2.4.1 วิธีสไลด์ (slide test) 25
2.4.2 วิธีหลอดทดลอง (tube method) 26
2.4.3 วิธี solid-phase technique หรือไมโครเพลท (microplate test) 26
2.4.4 วิธีคอลัมน์ (column agglutination technique: CAT) 27
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) 28
2.5.1 ความเข้มข้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody concentration) 28
2.5.2 สภาวะความเป็นกรด-เบส (pH) 29
2.5.3 อุณหภูมิ (temperature) 29
2.5.4 เวลาในการทำปฏิกิริยา (Incubation time) 29
2.5.5 Immunoglobulin class 29
2.6 สารเร่งปฏิกิริยา (Enhancement media หรือ potentiators) 30
2.6.1 Low Ionic Strength Solution (LISS) 30
2.6.2 Polyethylene glycol และ polybrene 30
2.6.3 Enzyme 31
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ 31
2.7.1 เทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษเพื่อสร้างขอบเขตส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) 31
2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจหมู่เลือด 37
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.1 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดสอบ 44
3.2 วัสดุและอุปกรณ์ 44
3.3. วิธีการดำเนินการวิจัย.....45
3.3.1 การออกแบบและสร้างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs.....45
3.3.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs.....47
3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs เปรียบเทียบกับวิธีหลอดมาตรฐานทดลอง.....51
3.3.4 การทดสอบความคงตัวของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 54
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย 55
4.1 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs.....55
4.1.1 ผลการทดสอบหาสารละลายที่เหมาะสมในการชะปฏิกิริยา 55
4.1.2 ผลการทดสอบหาชนิดของสารเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด.....56
4.1.3 ผลการทดสอบหาเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเหมาะสม.....59
4.1.4 ผลการทดสอบหาปริมาตรของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง.....60
4.1.5 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด 62
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ RBC Ag-typing profile PADs.....64
4.2.1 การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ โดยการอ่านผลและแปลผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า ..64

Chulalongkorn University

หน้า

4.2.2 การตรวจยืนยันชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (RBC) ในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ โดยการตรวจวัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J 67

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการศึกษาวิจัย 71

รายการอ้างอิง 83

ภาคผนวก 91

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 93

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดตอบสนอง (immunogenicity) ในแอนติเจนชนิดต่างๆ ของระบบ Rh, Kell, Kidd และ Duffy (21).....14

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล haplotype และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Rh (22).....16

ตารางที่ 3 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Kidd (23).....18

ตารางที่ 4 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Kell (23).....19

ตารางที่ 5 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ P1PK (23).....20

ตารางที่ 6 แสดงคุณลักษณะ ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีชนิดต่างๆ และความถี่ของแอนติเจนที่พบในแต่ละกลุ่มประชากร (13).....22

ตารางที่ 7 แสดงสถิติของแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่ส่งมาจากโรงพยาบาลต่างๆ ณ 24

ตารางที่ 8 แสดงสรุปผลการตรวจชนิดของแอนติเจนในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs แยกตามหมู่เลือดเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง จำนวน 50 ราย ดังนี้.....66

ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มแสงเฉลี่ยที่วัดได้ในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อ และแสดงผลต่างของความเข้มแสงเฉลี่ยของทั้งสองบริเวณในเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous ชนิด heterozygous และเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน แยกตามชนิดของแอนติเจนที่ทำการทดสอบ.....68

สารบัญรูป

รูปที่ 1 แผนผังสรุปกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (16) 12

รูปที่ 2 แสดงบริเวณ antigen sites และการกระจายตัวของโมเลกุลแอนติเจน D, C, E, c และ e ในหมู่เลือดระบบ Rh (บน) วงกลมสีฟ้า คือ แอนติเจน D (ล่าง) และวงกลมสีดำ ที่ตำแหน่ง 103 ของสายโพลีเปปไทด์ คือ แอนติเจน C/c และที่ตำแหน่ง 226 คือ แอนติเจน E/e (26) 16

รูปที่ 3 แสดงโมเลกุลแอนติเจน Jk^a และ Jk^b ในหมู่เลือดระบบ Kidd ที่ตำแหน่งที่ 280 17

รูปที่ 4 แสดงโมเลกุลแอนติเจน K และ k ในระบบ Kell ที่ตำแหน่งที่ 193 ของสายโพลีเปปไทด์ที่แทรกตัวอยู่ใน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (27).....19

รูปที่ 5 แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในครั้งแรกและครั้งที่สอง (21).....23

รูปที่ 6 แสดงผลของความเข้มข้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของ เม็ดเลือดแดง โดย (A) คือ prezone (B) Equivalence zone และ (C) postzone (21).....28

รูปที่ 7 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี Photolithography (35) 33

รูปที่ 8 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี Ink Jet Etching (40) 34

รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี wax printing (43).....35

รูปที่ 10 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี wax dipping (46).....36

รูปที่ 11 การสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี LFS (47).....37

รูปที่ 12 แสดงการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้หลักการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงบนกระดาษ a) แสดงรูปผลการทดสอบหมู่เลือดที่เกิดการจับกลุ่ม b) แสดงรูปผลการทดสอบหมู่เลือดที่ไม่เกิดการจับกลุ่ม (53) 38

รูปที่ 13 การทดสอบหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) โดยใช้กระดาษชนิดต่างๆ a) กระดาษซับ b) กระดาษกรอง c) กระดาษชำระ (10).....39

รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้การรายงานผลเป็นตัวอักษร (11).....40

รูปที่ 15 แสดงการอ่านผลและแปลผลการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้โปรแกรมที่พัฒนาขึ้นในโทรศัพท์มือถือสมาร์ทโฟน (54).....41

รูปที่ 16 แสดงรูปแบบของผลการทดสอบหมู่เลือด ABO และ Rh (D) แบบบาร์โคด (54).....41

รูปที่ 17 แสดงการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้หลักการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ออกแบบให้สามารถตรวจได้ทั้ง cell grouping และ serum grouping พร้อมกัน (55).....42

รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจหมู่เลือด B และ Rh (D) positive ในตัวอย่างเลือดโดยตรวจทั้ง cell grouping และ serum grouping พร้อมกันด้วยอุปกรณ์ paper-based device (55).....43

รูปที่ 19 แสดงตัวอย่างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 1 และ 2.....47

รูปที่ 20 แสดงขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs และการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือด 48

รูปที่ 21 แสดงบริเวณในการตรวจวัดค่าความเข้มแสงเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J.....53

รูปที่ 22 แสดงผลของสารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย PBS pH 7.4 และสารละลาย modified LISS ที่ใช้ในการชะปฏิกิริยาสำหรับชุดทดสอบ RBC-Ag typing profile PADs (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti-P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1 56

รูปที่ 23 แสดงผลของสารเจือจางชนิดต่างๆ ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย modified LISS และสารละลาย modified enzyme bromelin ที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างเลือด (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti- P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1 58

Chulalongkorn University

รูปที่ 24 แสดงผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-E กับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มี และไม่มีแอนติเจน E เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที 60

รูปที่ 25 แสดงผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti- P_1 กับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มี และไม่มีแอนติเจน P_1 เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที 60

รูปที่ 26 แสดงผลของปริมาตรแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ 1, 2 และ 3 ไมโครลิตร (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti- P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1 62

รูปที่ 27 แสดงผลของความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างที่ 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลาย modified LISS ทั้งที่มีแอนติเจนและไม่มีแอนติเจน E ทำปฏิกิริยากับ anti-E ที่ตรึงไว้บนในบริเวณทดสอบของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 63

รูปที่ 28 แสดงผลของความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างที่ 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลาย modified LISS ทั้งที่มีแอนติเจนและไม่มีแอนติเจน P_1 ทำปฏิกิริยากับ anti-P_1 ที่ตรึงไว้บนในบริเวณทดสอบของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 63

รูปที่ 29 แสดงการตรวจตัวอย่างเลือดที่มีแอนติเจน D+ K- C- E+ c+ และ e- ใน PADs 1 (A) และแอนติเจน Jk^a+ Jk^b- และ P_1 – ใน PADs 2 (B) ด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 65

รูปที่ 30 แสดงกราฟของความแตกต่างของค่าความเข้มแสงเฉลี่ยที่วัดได้ในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) ในเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous และ heterozygous เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน.....69

รูปที่ 31 แสดงตัวอย่างผลการตรวจชนิดของแอนติเจนหมู่เลือดต่างๆ ด้วยชุดทดสอบ 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การให้เลือดมีความจำเป็นในการรักษาผู้ป่วยในหลายกรณี เช่น ผู้ป่วยอุบัติเหตุฉุกเฉินที่มีการเสียเลือด ผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียที่มีภาวะซีด ผู้ป่วยที่ต้องทำการผ่าตัด หรือมีเลือดออกในช่องท้อง เป็นต้น (1) ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ก่อนการให้เลือดผู้ป่วยห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดจะต้องมีการพิจารณาเลือกเลือดที่มีความเหมาะสมโดยคำนึงถึงความปลอดภัยสูงสุดและมีความเสี่ยงต่ออันตรายต่างๆ จากการได้รับเลือดน้อยที่สุด โดยจะตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) ในผู้ป่วยที่ขอรับเลือด พร้อมทั้งตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงในซีรัม (antibody screening) จากนั้นจึงเลือกเลือดบริจาคที่มีหมู่เลือด ABO และ Rh (D) ตรงกันกับผู้ป่วยมาทำการทดสอบความเข้ากันได้ (compatibility test) ระหว่างเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคและซีรัมของผู้ป่วย ในกรณีที่ผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยเป็นบวก ห้องปฏิบัติการจะทำการทดสอบเพื่อแยกชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) ที่พบ พร้อมทั้งตรวจยืนยันว่าผู้ป่วยไม่มีแอนติเจนชนิดนั้นบนผิวเม็ดเลือดแดงเพิ่มเติม แล้วจึงเลือกเลือดที่ไม่มีแอนติเจนชนิดที่ตรงกับแอนติบอดีที่ตรวจพบในซีรัมของผู้ป่วยมาทำการทดสอบความเข้ากันได้เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ทั้งแบบเฉียบพลัน (immediate hemolytic transfusion reaction) และแบบล่าช้า (delayed hemolytic transfusion reaction) (2)

นอกจากหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) แล้ว บนผิวเม็ดเลือดแดงยังมีแอนติเจนของหมู่เลือดระบบอื่นๆ อีกกว่า 300 ชนิด หมู่เลือดหลักที่มีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ หมู่เลือดในระบบ Rh, MNS, Lewis, Kidd, Duffy, Kell และ P1PK เป็นต้น แอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดใน

ระบบต่างๆ ดังกล่าว อาจเกิดจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีภายหลังจากการได้รับเลือดที่มีแอนติเจนที่ไม่ตรงกัน จากการตั้งครรภ์ หรือการกระตุ้นจากสารตามธรรมชาติ (3) รายงานจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในการตรวจซีรัมของผู้ป่วยที่ส่งมาจากโรงพยาบาลต่างๆ ทั่วประเทศเพื่อตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี และจัดเตรียมเลือดบริจาคที่ไม่มีแอนติเจนชนิดที่ตรงกันกับแอนติบอดีที่พบในซีรัมให้แก่ผู้ป่วย พบว่า ตรวจพบแอนติบอดีในระบบ Rh (D, C, E, c และ e) ได้มากที่สุดคิดเป็น 42.2% ระบบ MNS คิดเป็น 31.9% ซึ่งแอนติบอดีที่พบในระบบ MNS นี้ส่วนใหญ่เป็นชนิด Mi^a ระบบ Kidd คิดเป็น 10.5% ระบบ Lewis คิดเป็น 5.9% และระบบ P1PK คิดเป็น 3.0% (4) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดในผู้ป่วยกลุ่มที่ต้องรับเลือดเป็นประจำ เช่น ผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย ซึ่งพบแอนติบอดีสูงถึง 17.2% และมากกว่า 40% เป็นแอนติบอดีต่อแอนติเจนหมู่เลือดในระบบ Rh (5) จึงทำให้การจัดเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วยทำได้ยากยิ่งขึ้น ในขณะที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดในผู้ป่วยกลุ่มที่รับเลือดทั่วไปเพียง 3.6% (6) มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทยจึงได้มีข้อแนะนำให้มีการตรวจแอนติเจน C, E, c, e และ Mi^a ก่อนการให้เลือดในผู้ป่วยที่รับเลือดเป็นครั้งแรกพร้อมทั้งเลือกเลือดบริจาคที่มีแอนติเจนตรงกันในการให้เลือด เพื่อป้องกันการสร้างแอนติบอดีดังกล่าว ทั้งนี้ควรตรวจแอนติเจนหมู่เลือดในระบบอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย หากทำได้ (7) ในต่างประเทศ ผู้ป่วยโรค sickle cell disease ที่ต้องรับเลือดเป็นประจำก็มีข้อเสนอแนะให้ตรวจแอนติเจน C, E, c, e และ K ก่อนการให้เลือดในผู้ป่วยที่รับเลือดเป็นครั้งแรกเช่นเดียวกัน (8)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดส่วนใหญ่จะตรวจเพียงหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) เท่านั้น การตรวจแอนติเจนชนิดอื่นๆ บนผิวเม็ดเลือดแดง เช่น แอนติเจน C, E, c, e และ K เป็นต้น จะทำในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย โรงพยาบาลศูนย์ หรือโรงพยาบาลประจำจังหวัดที่มีขนาดใหญ่เพียงบางแห่ง เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจมีราคาแพง และมีอายุการใช้งานสั้น ไม่คุ้มค่าใน

Chulalongkorn University

การทำการทดสอบ เมื่อพบว่าผู้ป่วยมี unexpected antibody โรงพยาบาลส่วนใหญ่จึงส่งตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยรายนั้นๆ ไปยังศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีและจัดเตรียมเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีความเข้ากันได้ และอาจต้องรอนาน 2-3 วัน หรือนานเป็นสัปดาห์ จึงทำให้เกิดความล่าช้าในการรักษาผู้ป่วย วิธีการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดโดยทั่วไปที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ได้แก่ วิธีหลอดทดลอง วิธีคอลัมน์ และวิธี solid phase โดยวิธีหลอดทดลองเป็นวิธีมาตรฐาน แต่แอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบมีราคาแพง ขั้นตอนการทดสอบต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงและการเขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผลปฏิกิริยา ไม่สามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้ วิธีคอลัมน์และ solid phase มีความไวและความถูกต้องแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัด คือ มีต้นทุนสูง ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์อื่นๆ ในการทดสอบเพิ่มเติม เช่น ไมโครเพลท คอลัมน์ และเครื่องปั่นเหวี่ยงเฉพาะสำหรับการปั่นอ่านผลของปฏิกิริยา เป็นต้น (9)

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (paper-based analytical devices: PADs) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีขนาดเล็ก ใช้น้ำยาและตัวอย่างเลือดในการตรวจวิเคราะห์น้อย จากงานวิจัยต่างๆ ก่อนหน้านี้ ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) บนกระดาษ เช่น การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการอ่านผลและแปลผลการทดสอบหมู่เลือด ABO และ Rh (D) ด้วยกระดาษชนิดต่างๆ คือ กระดาษซับ กระดาษกรอง และกระดาษชำระ ทำการทดสอบโดยหยด anti-A, anti-B และ anti-D ที่จุดเริ่มต้นและหยดตัวอย่างเลือดลงไปทำปฏิกิริยาแล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ อ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นบริเวณจุดเริ่มต้น และวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกชะ พบว่ากระดาษชำระให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนที่สุด (10) นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ที่ออกแบบให้มีบริเวณสำหรับหยดเลือดเป็นตัวอักษรตามหมู่เลือด A, B และ O สำหรับ Rh (D) ใช้สัญลักษณ์ + แทนผลบวกและสัญลักษณ์ –

Chulalongkorn University

แทนผลลบ หากเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงตัวอย่างจะไม่ถูกชะด้วย normal saline และแสดงผลของหมู่เลือดตามตัวอักษรนั้นๆ (11)

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาชุดทดสอบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (RBC Ag-typing profile PADs) ที่สามารถตรวจแอนติเจนได้พร้อมกันทั้งหมด 9 ชนิด โดยใช้หลักการการไหลของของเหลวในท่อขนาดเล็กบนกระดาษที่ออกแบบให้มีคุณสมบัติ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนที่ชอบน้ำ เป็นส่วนที่ใช้ตรึงแอนติบอดีและใช้ทำปฏิกิริยา ส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นส่วนที่กั้นไม่ให้สารแพร่ออกนอกบริเวณทดสอบ เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกันกับแอนติบอดีจะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มติดอยู่ในบริเวณทดสอบ ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีแอนติเจนจะไม่เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม เมื่อชะปฏิกิริยาด้วยสารละลาย phosphate buffer saline เม็ดเลือดแดงจะหลุดและเคลื่อนที่ไหลเข้าไปในท่อตามแรง capillary force สามารถอ่านผลและแปลผลการทดสอบที่เป็นผลบวกและผลลบของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่จุดสิ้นสุดปฏิกิริยาได้

ชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้งานได้จริง มีความสะดวกรวดเร็ว ใช้งานง่าย มีขนาดเล็กและน้ำหนักเบาจึงจัดเก็บได้ง่าย สามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้นานอย่างน้อย 3 เดือน สามารถสแกนหรือถ่ายรูปผลการทดสอบเก็บไว้ในแฟ้มประวัติของผู้ป่วยหรือผู้บริจาคโลหิตได้ ซึ่งจะมีประโยชน์ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบผลซ้ำหรือต้องการยืนยันผล ช่วยลดต้นทุนจากการประหยัดแอนติบอดีที่ใช้น้อยกว่าจากวิธีทั่วไปที่ถึง 50 เท่า ลดการสิ้นเปลืองวัสดุที่ต้องใช้แล้วทิ้ง เช่น สไลด์แก้ว คอลัมน์ หรือหลอดทดลองพลาสติก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความคงตัวของชุดทดสอบมากกว่า 1 เดือน โดยให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง และมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาร่วมกับภาคอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอนาคต โรงพยาบาลต่างๆ สามารถตรวจแอนติเจนหมู่เลือดต่างๆ เหล่านี้ได้เอง ช่วยลดระยะเวลาในการจัดหาเลือดที่มีความเข้ากันได้ให้กับผู้ป่วยในรายที่มี unexpected antibody เกิดขึ้นทั้งในกรณีปกติและ

Chulalongkorn University

กรณีเร่งด่วนเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับเลือดที่มีความเหมาะสมและปลอดภัยสูงสุด ให้ได้รับการรักษาที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบนกระดาษที่ใช้งานง่าย สามารถตรวจแอนติเจนหลายชนิดได้พร้อมกันและแปลผลได้ด้วยตาเปล่า
2. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบนกระดาษที่ใช้ปริมาตรแอนติบอดีในการตรวจน้อย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบนกระดาษ เพื่อสร้างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่สามารถตรวจแอนติเจนได้ทั้งหมด 9 ชนิดพร้อมกัน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและอ่านผลด้วยตาเปล่า ประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่สร้างขึ้นโดยใช้ตัวอย่างเลือดเหลือที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิด ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จากห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด สถาบันโรคทรวงอก ซึ่งเป็นตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิตและตัวอย่างเลือดที่เตรียมจากชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการตรวจที่ได้จากชุดทดสอบกับวิธีหลอดทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาวิธีตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง รวดเร็ว ใช้งานง่าย ให้ผลการทดสอบแอนติเจนได้พร้อมกันหลายชนิด ใช้ปริมาตรแอนติบอดีและตัวอย่างเลือดน้อย มีราคาถูกและต้นทุนต่ำ ชุดทดสอบถูกกำจัดทิ้งได้ง่าย สามารถเก็บผลการทดสอบเพื่อช่วยในการยืนยันผลการตรวจในกรณีที่ต้องการตรวจสอบผลซ้ำหรือทวนสอบได้

2. สามารถสร้างนวัตกรรมทางการแพทย์ ที่นำมาใช้ในการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดได้จริง มีประโยชน์ในการจัดหาเลือดและเตรียมเลือดที่มีความเหมาะสม มีความปลอดภัยสูงสุดและมีความเข้ากันได้ให้กับผู้ป่วยรายที่มี unexpected antibody เกิดขึ้น ทั้งในกรณีปกติและกรณีเร่งด่วน

3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาต่อยอดร่วมกับภาคอุตสาหกรรม เพื่อพัฒนาเป็นชุดทดสอบแอนติจนบนผิวเม็ดเลือดแดงสำเร็จรูป สำหรับนำไปใช้งานในโรงพยาบาลต่างๆ ภายในประเทศและในประเทศที่กำลังพัฒนาที่ยังขาดแคลนงบประมาณหรือเครื่องมือในการตรวจที่ทันสมัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.5 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลงานวิจัย

1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การให้เลือด (blood transfusion) และการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing)

2.1.1 การให้เลือด (blood transfusion)

การให้เลือด มีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนเลือดหรือเม็ดเลือดแดงที่สูญเสียไป ช่วยรักษาระดับฮีโมโกลบินและเพิ่มการนำออกซิเจนไปเลี้ยงร่างกาย มีความจำเป็นในการรักษาผู้ป่วยในกรณีต่างๆ เช่น ผู้ป่วยอุบัติเหตุฉุกเฉินที่มีการเสียเลือด (acute hemorrhage) ผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) หรือ sickle cell anemia ที่มีภาวะซีด ผู้ป่วยที่เม็ดเลือดแดงแตกหรือถูกทำลายจากการสร้างแอนติบอดีต่อตัวเองในระบบภูมิคุมกัน (autoimmune) ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของไขกระดูกในการสร้างเม็ดเลือดชนิดต่างๆ (bone marrow disorders) เช่น aplastic anemia หรือ myelodysplasia ผู้ป่วยที่ต้องทำการผ่าตัด (surgery) ผู้ป่วยที่เกิด trauma หรือมีเลือดออกในช่องท้อง (gastrointestinal bleeding) เป็นต้น (1) การให้เลือดเพื่อทำการรักษาผู้ป่วยนั้นจะขึ้นอยู่กับการพิจารณาของแพทย์ที่ทำการรักษาเป็นผู้ดูแลและประเมินอาการของผู้ป่วยถึงความจำเป็นในการขอรับเลือด และดำเนินการตามแนวปฏิบัติของกระบวนการเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วยในภาวะปกติ

2.1.2 กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing)

กระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด หรือ pre-transfusion testing เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญ ก่อนการให้เลือดและส่วนประกอบต่างๆ ของเลือดในการรักษาผู้ป่วย เพื่อป้องกันการให้เลือดบริจาคที่ไม่เข้ากัน (incompatible donor red blood cells)

ซึ่งส่งผลให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงจากการรับเลือด (hemolytic transfusion reaction) (2, 9, 12-16) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. แพทย์สั่งให้เลือดผู้ป่วย

2. พยาบาลทบทวนคำสั่งการให้เลือดของแพทย์และไม่มีข้อสงสัย แจ้งข้อมูลที่จำเป็นเกี่ยวกับการให้เลือดแก่ผู้ป่วยและญาติทราบพร้อมให้ลงลายมือชื่อในใบยินยอมรับเลือดเพื่อทำการรักษา จากนั้นพยาบาลกรอกรายละเอียดต่างๆ ในใบขอเลือด และส่งตัวอย่างที่ติดฉลากชื่อ-นามสกุล หมายเลขประจำตัวผู่ป่วย (HN) วัน เดือน ปี และเวลาในการเจาะเก็บเลือดเพื่อใช้ในการชี้บ่งตัวอย่าง พร้อมทั้งลงลายมือชื่อพยาบาลผู้ที่ทำการเจาะเก็บเลือดเพื่อให้สามารถทวนสอบกลับได้

3. ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดรับตัวอย่างและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดหลอดเลือดที่เจาะเก็บ ชื่อ-นามสกุล หมายเลขประจำตัวผู่ป่วย (HN) ของผู้ป่วย วัน เดือน ปี และเวลาในการเจาะเก็บเลือดในใบขอเลือดกับหลอดเลือดตัวอย่างให้ถูกต้องตรงกัน หากถูกต้องให้ดำเนินต่อตามแนวทางการจัดเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วย หากไม่ถูกต้องให้แจ้งพยาบาลเพื่อปฏิเสธการรับตัวอย่างและให้ดำเนินการแก้ไขใหม่ให้ถูกต้อง

4. ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดสืบค้นประวัติการตรวจหมู่เลือด ABO, Rh (D) และประวัติการรับเลือดของผู้ป่วย

5. ตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ของผู้ป่วยทั้งที่มีและไม่มีประวัติการตรวจเดิม พร้อมทั้งตรวจคัดกรองแอนติบอดี (antibody screening) ในซีรัมของผู้ป่วย โดยทดสอบกับ standard O cell (O_1 และ O_2 cells) ที่มีแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงครอบคลุมทุกแอนติเจนที่มีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ แอนติเจน D, C, E, c, e, M, N, S, s, Mi^a, P_1, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a และ Jk^b

5.1 ผลการตรวจหมู่เลือดของผู้ป่วยที่ไม่ตรงกับประวัติเดิม ให้หาสาเหตุ ถ้าจำเป็นขอให้พยาบาลส่งตัวอย่างเลือดมาให้ใหม่ เพื่อตรวจหมู่เลือดซ้ำ

5.2 ถ้าผู้ป่วยมีผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีเป็นบวก แสดงว่า ผู้ป่วยมี unexpected antibody ห้องปฏิบัติการจะต้องทำการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดี (antibody identification) ในผู้ป่วยโดยการใช้ชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) เมื่อทราบชนิดของแอนติบอดีในผู้ป่วย ต้องตรวจยืนยันว่าผู้ป่วยไม่มีแอนติเจนชนิดบนผิวเม็ดเลือดแดงชนิดที่ตรงกับแอนติบอดีที่พบและผลการตรวจจะต้องเป็นลบจึงจะสรุปว่าผู้ป่วยมีแอนติบอดีชนิดนั้นจริง

5.3 การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (RBC Ag-phenotyping test) เช่น แอนติเจน D, K, C, E, c และ e ในเลือดของผู้บริจาคโลหิต เพื่อนำเลือดที่มีแอนติเจนเป็นลบกับแอนติบอดีชนิดที่ตรวจแยกได้จากซีรัมของผู้ป่วยไปทำการทดสอบความเข้ากันได้ในขั้นตอนต่อไป เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ทั้งแบบเฉียบพลัน (immediate hemolytic transfusion reaction) และแบบล่าช้า (delayed hemolytic transfusion reaction) ที่อาจเกิดขึ้นได้ภายหลังจากการได้รับเลือด นอกจากนี้การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงยังมีประโยชน์และความสำคัญในด้านอื่นๆ ได้แก่ 1) การตรวจชนิดของแอนติเจนในผู้ป่วยว่าไม่มีแอนติเจนชนิดนั้น ๆ บนผิวเม็ดเลือดแดงจริงเพื่อยืนยันผลการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีที่พบในซีรัม 2) การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในเลือดของผู้บริจาคโลหิตเพื่อเป็นข้อมูลความถี่ (prevalence) ของแอนติเจนชนิดต่างๆ ที่พบในกลุ่มประชากร

5.4 ถ้าผู้ป่วยมีผลการตรวจคัดกรองแอนติบอดีเป็นลบและผลการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO, Rh (D) ตรงกับประวัติเดิม หรือเป็นการขอรับเลือดครั้งแรกโดยไม่มีประวัติเดิม ให้ดำเนินการทดสอบความเข้ากันได้ในขั้นตอนต่อไป

Chulalongkorn University

5.5 ในกรณีที่ไม่สามารถหาเลือดบริจาคที่มีแอนติเจนเป็นลบต่อแอนติบอดีชนิดนั้นๆ มาตรวจความเข้ากันได้เพื่อเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยได้ ห้องปฏิบัติการจะประสานติดต่อกับภาคบริการโลหิตฯ เพื่อขอเลือดชนิดดังกล่าวจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หรือติดต่อขอความช่วยเหลือจากโรงพยาบาลศูนย์ หรือโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในบริเวณใกล้เคียง หรือส่งต่อผู้ป่วยเพื่อไปทำการรักษาในโรงพยาบาลที่มีศักยภาพในการแก้ปัญหานี้ต่อไป

6. การตรวจความเข้ากันได้ (compatibility test) โดยการ cross matching ระหว่างเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตและซีรัมของผู้ป่วยที่ได้จากขั้นตอนที่ 5 โดยเลือกเลือดบริจาคที่มีหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ตรงกันกับผู้ป่วยมาทดสอบ โดยวิธี antihumanglobulin (Coomb technique)

7. รับรองผลการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ซ้ำจากหลอดเลือดเดิม โดยเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการอีกคน หรือในกรณีที่มีเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานเพียงคนเดียวให้ตรวจหมู่เลือดซ้ำในเวลาที่ต่างกัน โดยใช้วิธีมาตรฐานวิธีใดวิธีหนึ่ง รวมทั้งวิธีไสลด์ เพื่อให้มั่นใจว่าไม่เกิดการสลับตัวอย่างเลือดในการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) ในครั้งแรก จากนั้นบันทึกผลการ cross matching และพิมพ์ใบคล้องโลหิต เก็บเข้าตู้เย็นเก็บเลือดเตรียมจ่าย

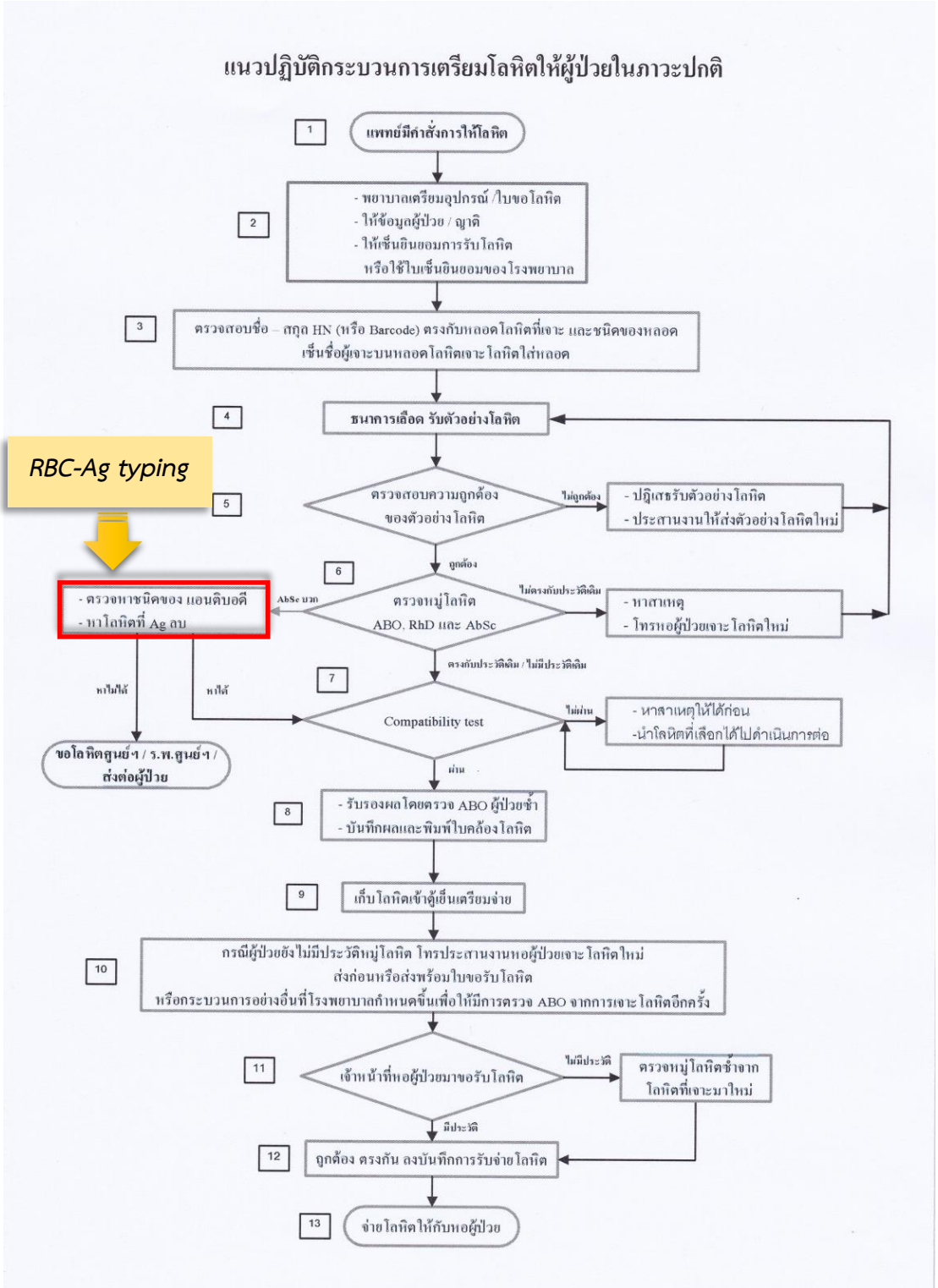
8. กรณีที่ผู้ป่วยไม่มีประวัติการตรวจหมู่เลือด ให้ประสานไปยังหอผู้ป่วยเพื่อขอเจาะเลือดตัวอย่างส่งมาอีกครั้ง เพื่อตรวจยืนยันหมู่เลือด ABO และ Rh (D) และยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการ cross matching สำหรับเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วยว่าไม่ผิดคนโดยส่งมาก่อนหรือส่งมาพร้อมกับใบขอรับเลือด

9. เจ้าหน้าที่หอผู้ป่วยมาติดต่อรับเลือด ในกรณีที่ผู้ป่วยมีประวิติหมู่เลือดแล้วสามารถดำเนินการตรวจสอบความถูกต้องของรายละเอียดในใบขอรับเลือดและใบขอเลือด สำหรับในกรณีที่ผู้ป่วยไม่มีประวัติหมู่เลือดให้ตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) ซ้ำอีกครั้งจากตัวอย่างเลือดที่ส่งมาใหม่

เมื่อตรวจแล้วว่าหมู่เลือดถูกต้องตรงกัน ลงบันทึกการรับจ่ายเลือด และจ่ายเลือดให้กับผู้มารับไปยังหอผู้ป่วยได้

การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (pre-transfusion testing) ในกระบวนการดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปเป็นแนวปฏิบัติในการเตรียมโลหิตให้ผู้ป่วยได้ดังรูปที่ 1 (16)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 1 แผนผังสรุปกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการก่อนการให้เลือด (16)

2.2 แอนติเจนของหมู่เลือด (Blood group antigens)

แอนติเจนของหมู่เลือดที่พบบนผิวเม็ดเลือดแดงในปัจจุบันมีทั้งหมดกว่า 300 ชนิด ถูกจัดออกเป็นระบบต่างๆ ทั้งหมด 29 ระบบ ซึ่งได้กำหนดหมายเลข 001-029 ตามการค้นพบก่อนและหลังโดย International Society of Blood Transfusion (ISBT) หมู่เลือดที่มีความสำคัญในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดนั้นมีทั้งหมด 10 ระบบ ได้แก่ ระบบ ABO, MNS, P1PK, Rh, Lutherland, Kell, Lewis, Duffy, Kidd และ Diego (17)

แอนติเจนของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ตั้งอยู่บนผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอก (extracellular membrane) ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต มีการเรียงตัวของโมเลกุลเป็นแบบเส้นตรง (linearity structure) แบบทุติยภูมิ (secondary structure) หรือแบบตติยภูมิ (tertiary structure) แตกต่างกันในแต่ละแอนติเจน นอกจากนี้คุณลักษณะอื่นๆ เช่น ขนาดโมเลกุล ความซับซ้อนโครงสร้าง ประจุ บริเวณของแอนติเจนที่แอนติบอดีเข้าไปทำปฏิกิริยา (antigenic determinant หรือ antigen site) ความสามารถในการถูกละลายได้และความสามารถในการถูกย่อยได้ของโมเลกุลในแอนติเจนหมู่เลือดแต่ละระบบ เป็นต้น เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันในระบบภูมิคุ้มกัน เรียกว่า immunogenicity ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังมีผลจากปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น สภาวะร่างกายของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ โรค พันธุกรรม หรือฮอร์โมน เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่มีความแรงแตกต่างกันในการตรวจชนิดของแอนติเจนหมู่เลือดแต่ละชนิด (18-20)

Chulalongkorn University

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้เกิดตอบสนอง (immunogenicity) ในแอนติเจนชนิดต่างๆ ของระบบ Rh, Kell, Kidd และ Duffy (21)

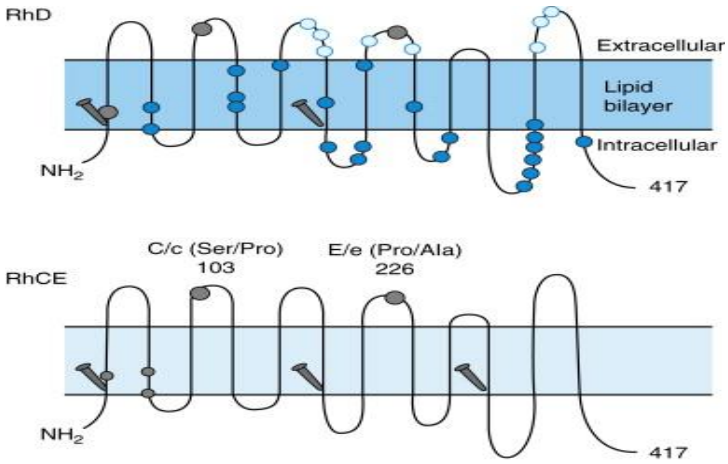
Blood group system	Type of antigens	Immunogenicity (%)
Rh	D	50.00
	C	0.11
	E	1.69
	c	2.05
	e	0.56
Kell	K	5.00
	k	1.50
Kidd	Jk^a	0.07
	Jk^b	0.03
Duffy	Fy^a	0.23

2.2.1 Rh blood group system [ISBT004]

หมู่เลือดระบบ Rh ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1939 โดย Levine และ Stetson จากการเกิดปฏิกิริยา hemolytic disease of the newborn (HDN) ในทารกแรกคลอดที่แอนติบอดีจากเลือดของแม่สามารถถ่ายทอดเข้าไปสู่กระแสเลือดของลูกทำให้เม็ดเลือดแดงของลูกถูกทำลาย เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงของลูกในกระแสเลือด โดยแอนติเจนของหมู่เลือดระบบนี้มีมากกว่า 50 ชนิด ซึ่งแอนติเจนหลัก ได้แก่ แอนติเจน D, C, E, c และ e เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญทางคลินิก

และมีความสำคัญรองลงมาจากหมู่เลือดในระบบ ABO ประกอบด้วยยีน *RHD* ที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน D และยีน *RHCE*, *RHCe*, *RHc*E และ *RHce* ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน C, E, c, e ตั้งอยู่บน short arm ของโครโมโซมคู่ที่ 1 ตำแหน่ง 1p34.3 - p36.13 ปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดระบบนี้มีผลของ dosage effect ในฟีโนไทป์ชนิด homologous และ heterozygous ทำให้ผลการตรวจแอนติเจนในทั้งสอง ฟีโนไทป์มีความแรงในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (immunogenicity) ที่แตกต่างกันในแต่ละแอนติเจนเรียงลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ แอนติเจน D > c > E > C > e ซึ่งเกิดจากการที่แอนติเจนแต่ละชนิดมีคุณลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น จำนวนโมเลกุลและการกระจายตัวของแอนติเจนบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2 โมเลกุลของแอนติเจน C/c อยู่ในตำแหน่งที่ 103 ของสายโพลีสายเปปไทด์ (polypeptide) ที่แทรกตัวอยู่ในบริเวณ lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ มีกรดอะมิโนเป็นชนิด Serine (Ser) ในแอนติเจน C และชนิด Proline (Pro) ในแอนติเจน c และโมเลกุลของแอนติเจน E/e มีกรดอะมิโนเป็นชนิด Proline (Pro) ในแอนติเจน E และชนิด Alanine (Ala) ในแอนติเจน e ที่ตำแหน่ง 226 โมเลกุลของแอนติเจน C, E, c และ e แทนด้วยวงกลมสีดำ และโมเลกุลของแอนติเจน D แทนด้วยวงกลมสีฟ้า จะเห็นได้ว่า antigen site ของแอนติเจนชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน โดยแอนติเจน D มีจำนวนโมเลกุลและการกระจายตัวบนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มากกว่าแอนติเจน C, E, c และ e เป็นต้น ส่งผลให้สามารถจับกับแอนติบอดีและเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่า และชนิดของ haplotype และความถี่ (prevalence) ที่พบในหมู่เลือดระบบ Rh มีความแตกต่างกันในกลุ่มของประชากรชาวผิวขาว ชาวผิวดำและชาวเอเชีย ดังแสดงในตารางที่ 2 (22-26)

Chulalongkorn University



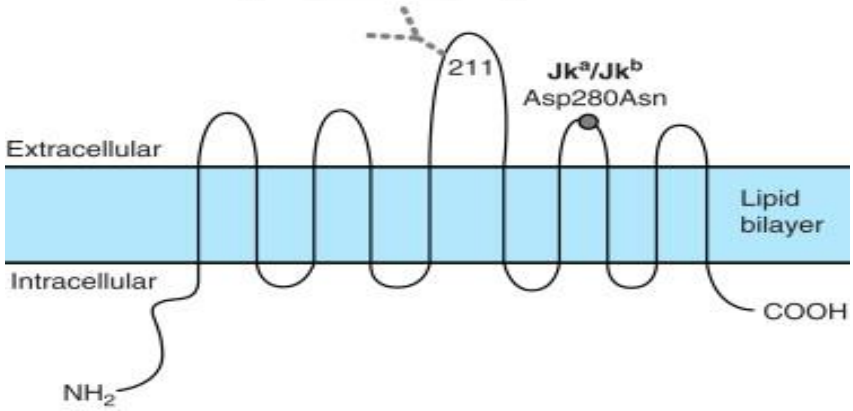
รูปที่ 2 แสดงบริเวณ antigen sites และการกระจายตัวของโมเลกุลแอนติเจน D, C, E, c และ e ในหมู่เลือดระบบ Rh (บน) วงกลมสีฟ้า คือ แอนติเจน D (ล่าง) และวงกลมสีดำ ที่ตำแหน่ง 103 ของสายโพลีเปปไทด์ คือ แอนติเจน C/c และที่ตำแหน่ง 226 คือ แอนติเจน E/e (26)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล haplotype และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Rh (22)

Haplotype	Shorthand for Haplotype	Prevalence		
		White (%)	Black (%)	Asian (%)
DCe	R_1	42	17	70
DcE	R_2	14	11	21
Dce	R_0	4	44	3
DCE	R_z	<0.01	<0.01	1
ce	R	37	26	3
Ce	r’	2	2	2
cE	r’’	1	<0.01	<0.01
CE	r^y	<0.01	<0.01	<0.01

2.2.2 Kidd blood group system [ISBT 009]

หมู่เลือดระบบ Kidd (Jk) ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1951 โดย Allen และ Colleagues จากการเกิดปฏิกิริยา hemolytic disease of the newborn (HDN) แอนติเจนหลักของระบบ คือ แอนติเจน Jk^a และ Jk^b ถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *JK* ซึ่งตั้งอยู่บน long arm ของโครโมโซมคู่ที่ 18 ตำแหน่ง 18q11 - q12 มีผลของ dosage effect ในการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ในฟีโนไทป์ที่เป็นชนิด homologous และ heterozygous เช่นเดียวกับแอนติเจนในหมู่เลือดระบบ Rh โมเลกุลของแอนติเจน Jk^a/Jk^b อยู่ในตำแหน่งที่ 280 ของสายโพลีสายเปปไทด์ (polypeptide) ที่แทรกตัวอยู่ใน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ มีกรดอะมิโนเป็นชนิด Aspartic (Asp) ในแอนติเจน Jk^a และมีกรดอะมิโนเป็นชนิด Asparagine (Asn) ในแอนติเจน Jk^b ดังแสดงในรูปที่ 3 ฟีโนไทป์ (phenotypes) และความถี่ (frequencies) ของแอนติเจนในระบบ Kidd แยกตามกลุ่มประชากร ดังแสดงในตารางที่ 3 (25, 27)



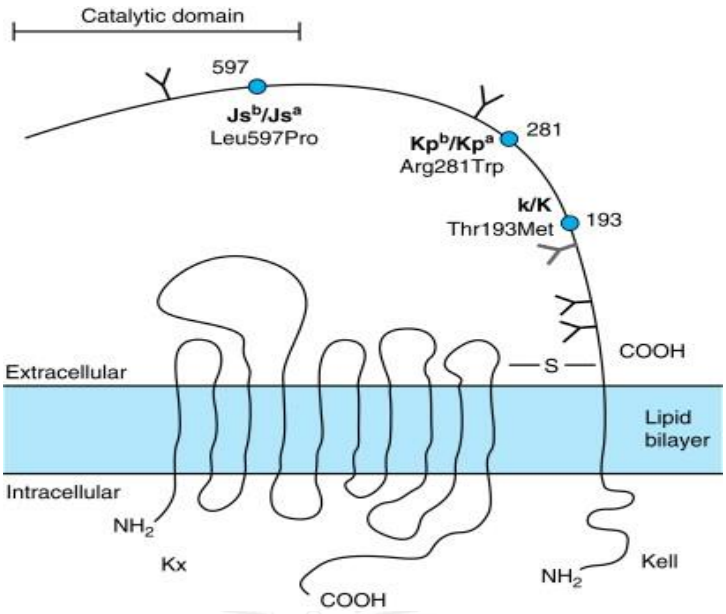
รูปที่ 3 แสดงโมเลกุลแอนติเจน Jk^a และ Jk^b ในหมู่เลือดระบบ Kidd ที่ตำแหน่งที่ 280 ของสายโพลีเปปไทด์ที่แทรกตัวอยู่ใน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (27)

ตารางที่ 3 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Kidd (23)

Phenotypes	Frequencies		
	White (%)	Black (%)	Asian (%)
Jk (a+b-)	26.3	51.1	23.22
Jk (a+b+)	50.3	40.8	49.94
Jk (a-b+)	23.4	8.1	26.84
Jk (a-b-)	<0.01	<0.01	0.9 to <0.1

2.2.3 Kell blood group system [ISBT 006]

หมู่เลือดระบบ Kell ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1946 โดย Coombs, Mourant และ Race จากการพบแอนติบอดีในซีรัมของแม่ที่ส่งผลให้เกิด Hemolytic disease of the newborn HDN ในลูก หมู่เลือดระบบนี้มีแอนติเจนหมดมากกว่า 34 ชนิด การแสดงออกของแอนติเจนของหมู่เลือดในระบบนี้จะถูกควบคุมโดยยีน *KEL* ซึ่งตั้งอยู่บน long arm ของโครโมโซมคู่ที่ 7 ตำแหน่ง 7q33 โมเลกุลของแอนติเจน K/k ตั้งอยู่ในตำแหน่งที่ 193 ของสายโพลีสายเปปไทด์ (polypeptide) ที่แทรกตัวอยู่ใน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ มีกรดอะมิโนเป็นชนิด Threonine (Thr) ในแอนติเจน K และมีกรดอะมิโนเป็นชนิด Methionine (Met) ดังแสดงในรูปที่ 4 ในแอนติเจน k แอนติเจนหลักในระบบ Kell คือ K และ k ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในประชากรชาวผิวขาว (whites) และพบได้น้อยมากในประชากรชาวเอเชีย โดยมีฟีโนไทป์และความถี่ของแอนติเจนในกลุ่มประชากรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 (23, 27)



รูปที่ 4 แสดงโมเลกุลแอนติเจน K และ k ในระบบ Kell ที่ตำแหน่งที่ 193 ของสายโพลีเปปไทด์ที่แทรกตัวอยู่ใน lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ (27)

ตารางที่ 4 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ Kell (23)

Phenotypes	Frequencies	
	White (%)	Black (%)
K-k+	91.0	98.0
K+k+	8.8	2.0
K+k-	0.2	Rare

2.2.4 P1PK blood group system [SBT003]

หมู่เลือดระบบ P1PK ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1927 โดย Landsteiner และ Levine จากการกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงของคนที่ได้ฉีดเข้าไปในกระต่าย หมู่เลือดระบบ

P1PK ถูกเปลี่ยนชื่อมาจากชื่อเดิม คือ หมู่เลือดระบบ P ในปี ค.ศ. 2010 ประกอบด้วยแอนติเจนทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ แอนติเจน P_1, P และ P^k มียีน *P_1* ตั้งอยู่บน long arm ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ตำแหน่ง 22q11.2 ในการควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน P_1 ยีน *GLOB* ตั้งอยู่บน long arm ของโครโมโซมคู่ที่ 3 ตำแหน่ง 3q25 ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน P และยีน *P^k* ซึ่งตั้งอยู่บน long arm ของโครโมโซมคู่ที่ 22 ตำแหน่ง 22q13.2 สำหรับควบคุมการแสดงออกของแอนติเจน P^k จึงทำให้หมู่เลือดในระบบนี้แบ่งออกเป็น 5 ฟีโนไทป์ (phenotype) ได้แก่ P_1, P_2, p, P_1^k และ P_2^k โดยแต่ละฟีโนไทป์จะมีความถี่ในการแสดงออกชนิดแอนติเจนและชนิดของแอนติบอดีที่สามารถพบได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 (23, 28)

ตารางที่ 5 แสดงฟีโนไทป์และความถี่ที่พบแยกตามกลุ่มประชากรต่างๆ ของหมู่เลือดในระบบ P1PK (23)

Phenotype	Frequency	Antigen (s)	Antibody
P_1	75%	P_1, P	None
P_2	25%	P	Anti-P_1
p	<1%	None	Anti-P + P_1 + P^k
P_1^k	<1%	P_1, P^k	Anti-P
P_2^k	<1%	P^k	Anti-P, Anti-P_1

2.3 แอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือด (Blood Group Antibodies)

แอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดที่สร้างขึ้นในร่างกาย (unexpected antibody) เกิดได้จากหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น จากการที่เคยรับเลือดที่มีแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ไม่ตรงกัน

ระหว่างผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยที่ได้รับเลือด เช่น แอนติเจน D, K, C, E, c และ e ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของผู้ป่วยที่ได้รับเลือดจึงเกิดการให้สร้างแอนติบอดีขึ้นมาต้านแอนติเจนที่ได้รับ โดยการตอบสนองแบบ Acquire Immune response (primary immune response) ชนิด red cell immune type หรือเป็นแอนติบอดีชนิดที่ร่างกายสร้างขึ้นมาโดยธรรมชาติ (natural occurring antibody) หรือแบบ non-red cell immune type โดย unexpected antibody ที่เกิดขึ้นแบ่งได้เป็นสองชนิดคือ alloantibody เป็นแอนติบอดีที่ผู้สร้างไม่มีแอนติเจนชนิดนั้นอยู่และเป็นแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่ตรวจพบ และ autoantibody เป็นแอนติบอดีที่เกิดจากการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้กับแอนติเจนของผู้สร้างเอง โดยแอนติบอดีที่มีการสร้างขึ้นจะถูกพิจารณาความสำคัญทางคลินิกในการให้เลือดจากคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่

1. แอนติบอดีที่เกิดขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยา Hemolytic transfusion reactions (HTR) ชนิด immediate หรือ delayed HTR จากการรับเลือดได้หรือไม่
2. แอนติบอดีที่เกิดขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยา Hemolytic disease of the newborn (HDN) ได้หรือไม่
3. แอนติบอดีที่เกิดขึ้นทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ เช่น การจับได้กับ complement และเกิด hemolysis ได้หรือไม่

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในการสร้างแอนติบอดี มีความแตกต่างกันจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจนแปลกปลอม (foreign antigen) ที่ร่างกายได้รับในครั้งแรกและครั้งที่สอง การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในครั้งแรก (primary immune respond) จะช้ากว่าการตอบสนองในครั้งที่สอง (secondary immune respond) เนื่องจากครั้งที่สอง memory B-cells ในระบบ humeral immunity สามารถจดจำแอนติเจนที่ได้รับเข้าไปในครั้งแรกได้ จึงกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีรวมทั้งสารน้ำต่างๆ มาทำลายแอนติเจนแปลกปลอมนั้นๆ ได้อย่างรวดเร็ว โดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แอนติบอดีต่อแอนติเจนของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมีคุณลักษณะและความสำคัญทางคลินิกที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 6 (18, 21, 29)

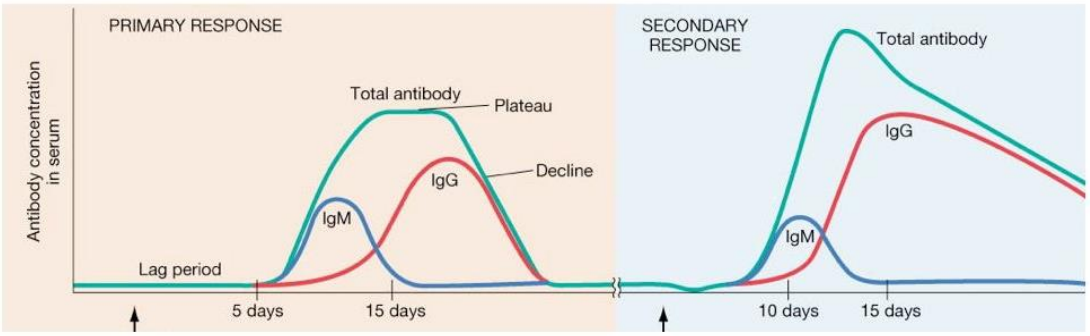
ตารางที่ 6 แสดงคุณลักษณะ ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีชนิดต่างๆ และความถี่ของแอนติเจนที่พบในแต่ละกลุ่มประชากร (13)

Type of antibody	Ig Class		In vitro characteristics			Clinical significant			Antigen frequency (%)		
	IgM	IgG	NSS RT	IAT	Papain 37 °C*	C-binding	HDFN	HTR	Caucasians	Blacks	Asians
Anti-P_1	Yes	rare	Yes	Very rare	++	Rare	No	No to moderate/ Delayed	79	94	20
Anti-Jk^a	Yes Many IgG+ IgM		Rare	Yes	+	Yes	Mild to moderate	No to severe/ Immediate or delayed	77	92	72
Anti-Jk^b	Yes Many IgG+ IgM		Rare	Yes	+	Yes	No to mild	No to severe/ Immediate or delayed	74	49	76
Anti-K	Some	Most	Some	Yes	-	Rare	Mild to severe	Mild to severe/ Delayed	9	2	Rare
Anti-E	Yes	Yes	Some	Yes	++	No	Mild	Mild to severe	29	22	39
Anti-e	Some	Most	Rare	Yes	++	No	Mild to severe	Mild to moderate	98	98	96
Anti-C	Yes	Yes	Rare	Yes	++	No	Mild	Mild to severe	68	27	93
Anti-c	Some	Most	Rare	Yes	++	No	Mild	Mild to severe	80	98	47

สัญลักษณ์และคำย่อ

* Papain treated cells, 37 °C		HDFN	Hemolytic disease of the fetus and newborn
++	Markedly enhanced	HTR	Hemolytic transfusion reaction
+	Enhanced	IAT	Indirect antiglobulin test
-	Unaffected	C	Complement

นอกจากนี้แอนติบอดีที่สร้างขึ้นยังมีปริมาณที่มากกว่า มีความแรง (titer) ที่สูงกว่าและสร้างเป็นชนิด IgG เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การสร้างแอนติบอดีชนิด IgM มีปริมาณที่น้อยลง อีกทั้งแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในครั้งที่สองจะมีความจำเพาะ (specificity) โดยมีความแรงในการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน (affinity) และมีความแข็งแรงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากกว่าในครั้งแรก ดังแสดงในรูปที่ 5 (21) ดังนั้นการตรวจชนิดของแอนติเจนหมู่เลือดทั้งในระบบ ABO Rh (D) และระบบอื่นๆ จึงมีความสำคัญในการป้องกันการสร้างแอนติบอดีในผู้ป่วยจากการได้รับเลือดที่มีแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ไม่ตรงกัน ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยา hemolytic transfusion reactions ทั้งในแบบเฉียบพลันและแบบล่าช้า ช่วยให้มีความปลอดภัย ลดความเสี่ยงจากอันตรายต่างๆ ในการรับเลือดและช่วยให้มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 5 แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในครั้งแรกและครั้งที่สอง (21)

จากการศึกษาแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบต่างๆ ในผู้ป่วยที่จัดหาเลือดที่เข้ากันได้ยากจากโรงพยาบาลต่างๆ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 2,821 ราย ในระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2548 – วันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2549 พบว่า มีซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกในขั้นตอนการตรวจคัดกรองแอนติบอดี (antibody screening) จำนวน 2,342 ราย คิดเป็น 83.0% สามารถบอกชนิดของแอนติบอดีได้ จำนวน 1,766 ราย คิดเป็น 75.4% แยกตามระบบได้ดังแสดงตารางที่ 7 (4)

ตารางที่ 7 แสดงสถิติของแอนติบอดีที่ตรวจพบในผู้ป่วยที่ส่งมาจากโรงพยาบาลต่างๆ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ระหว่างวันที่ 1 ต.ค. 2548 – วันที่ 30 ก.ย. 2549 (4)

Blood group system	No of antibodies	%
Rh	1,029	42.2
MNS	778	31.9
Kidd	256	10.5
Lewis	145	5.9
P	72	3.0
Duffy	66	2.7
I	58	2.4
Diego	30	1.2
H	4	0.2
Total	2,438	100

นอกจากนี้ผู้ป่วยกลุ่มที่ต้องมีการรับเลือดเป็นประจำ เช่น ผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียเป็นผู้ป่วยกลุ่มที่มีโอกาสสร้างแอนติบอดีได้หลายชนิด ทำให้การจัดเตรียมเลือดให้แก่ผู้ป่วยทำได้ยากยิ่งขึ้น มีรายงานการวิจัยพบว่าตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียในประเทศไทยสูงถึง 17.2% ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยมากกว่า 40% ของผู้ป่วยที่ตรวจพบแอนติบอดี พบว่า เป็นแอนติบอดีต่อหมู่เลือดในระบบ Rh (5) แต่ตรวจพบแอนติบอดี ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีการรับเลือดทั่วไปเพียง 3.6% เท่านั้น (6) ด้วยเหตุนี้มูลนิธิโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทยจึงได้มีข้อแนะนำให้มีการตรวจแอนติเจน C, E, c, e และ Mi^a ก่อนการให้เลือดในผู้ป่วยที่รับเลือดเป็นครั้งแรก และเลือกเลือดของผู้บริจาคที่มีแอนติเจนชนิดที่ตรงกันให้แก่ผู้ป่วยเพื่อป้องกันการสร้างแอนติบอดีดังกล่าว ทั้งยังควรตรวจแอนติเจนระบบอื่นๆ เพิ่มเติมด้วยหากสามารถทำได้ (7) และในต่างประเทศ ผู้ป่วยโรค sickle cell disease ที่ต้องรับเลือดเป็นประจำก็มีข้อเสนอแนะให้ตรวจแอนติเจนก่อนการให้เลือด โดยทำการตรวจแอนติเจน K, C, E, c และ e ในผู้ป่วยที่รับเลือดเป็นครั้งแรกเช่นเดียวกัน (8)

2.4 วิธีการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (Red blood cell Ag-typing test) ทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด

2.4.1 วิธีสไลด์ (slide test)

การตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีสไลด์นั้นเป็นวิธีที่ง่าย มีความสะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างเลือด และสามารถอ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นได้ด้วยตาเปล่าจากการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีความเหมาะสมกับการใช้งานในกรณีที่ต้องการผลเร่งด่วน หรือในกรณีที่เป็นการตรวจซ้ำเพื่อยืนยันผลการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ เช่น วิธีหลอดทดลอง วิธีคอลัมน์ หรือวิธีไมโครเพลท แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ มีความไวในการทดสอบต่ำ ไม่

สามารถอ่านผลระดับความแรงของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและไม่สามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้ และมีความเสี่ยงต่อการสัมผัสกับเชื้อโรคจากสิ่งส่งตรวจ (12, 15)

2.4.2 วิธีหลอดทดลอง (tube method)

วิธีหลอดทดลอง เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดต่างๆ มีความไวและความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถอ่านผลปฏิกิริยาที่ให้ผลการทดสอบอ่อน (weak) ปฏิกิริยาที่ให้ผลบวกตั้งแต่ 1^+ จนถึง 4^+ รวมทั้งอ่านผลการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ที่เกิดขึ้นได้ แต่ข้อจำกัดของวิธีหลอดทดลอง คือ ต้องมีการ incubate ตัวอย่างเลือดกับแอนติบอดีก่อนปั่นอ่านผลของปฏิกิริยา 5 – 15 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทำการทดสอบ ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงการตกตะกอนและการเขย่าหลอดทดลองเพื่ออ่านผล ต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผลของปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยาที่มีผลการทดสอบอ่อน เช่น ปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจากการจับกันของแอนติเจน Jk^a กับ anti-Jk^a และแอนติเจน Jk^b กับ anti-Jk^b ในหมู่เลือดระบบ Kidd การเขย่าหลอดทดลองที่แรงเกินไปอาจทำให้อ่านผลของปฏิกิริยาผิดพลาดได้ และผลการทดสอบอาจไม่คงที่ ไม่สามารถเก็บผลของการทดสอบไว้ได้ ทั้งยังมีต้นทุนสูงจากการสิ้นเปลืองแอนติบอดีและหลอดทดลองพลาสติกที่มีการใช้แล้วทิ้ง (12, 18, 30)

2.4.3 วิธี solid-phase technique หรือไมโครเพลท (microplate test)

วิธี solid-phase technique เป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีหลอดทดลองในการใช้สำหรับตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง ในปี ค.ศ. 1978 โดย Rosenfield และคณะ ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Plapp และคณะ ก็ได้รายงานการตรวจแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธี solid-phase red cell adherence (SPRCA) ซึ่งทำการทดสอบโดยการตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเอาไว้ที่ก้นหลุมเป็น monolayer และหยดตัวอย่างเลือดลงไปทำการทดสอบ ทิ้งให้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาและปั่นอ่านผลด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเฉพาะสำหรับไมโครเพลท ผลบวก เม็ดเลือดแดงเกิดการ

จับกลุ่มและแผ่กระจายที่ก้นหลุม ในขณะที่ผลลบ เม็ดเลือดแดงไม่จับกลุ่มและตกเป็นเม็ดกระดุม เป็นวิธีที่ง่ายต่อการแปลผล ช่วยลดระยะเวลาตรวจในกรณีที่สิ่งส่งตรวจมีปริมาณมาก แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ต้นทุนในการทดสอบสูง ใช้เวลานาน ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์อื่นๆ ในการทดสอบ เช่น ไมโครเพลทและเครื่องปั่นเหวี่ยงการตกตะกอนเฉพาะสำหรับไมโครเพลท อีกทั้งยังไม่สามารถบอกระดับความแรงของปฏิกิริยาจับกลุ่มได้ สามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้เพียง 2-3 วัน เป็นต้น (12, 30-32)

2.4.4 วิธีคอลัมน์ (column agglutination technique: CAT)

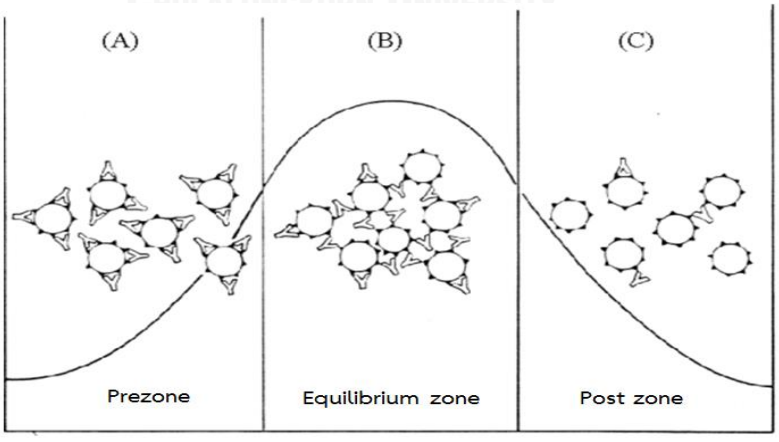
วิธีคอลัมน์ เป็นวิธีที่ Dr. Yves Lapierre of Lyon และคณะได้พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ.1985 เพื่อให้มีการอ่านผลการทดสอบง่าย มีความเที่ยงตรง เนื่องจากจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา (end point) มีความคงตัว (stable) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง โดยคอลัมน์จะมีลักษณะเป็น microtube ประกอบด้วย chamber และ column chamber สำหรับทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงกับซีรัม ภายในบรรจุสาร dextrane acrylamide gel ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางสำหรับกรองเม็ดเลือดแดงที่จับกลุ่มและไม่จับกลุ่มในปฏิกิริยา เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนจะจับได้กับแอนติบอดีอย่างจำเพาะเกิดเป็น antigen-antibody complex สามารถอ่านผลความแรงของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในการทดสอบได้ตั้งแต่ระดับ w^+ - 4^+ รวมทั้ง mixed field (MF) ได้เช่นเดียวกับวิธีหลอด โดยไม่ต้องมีการเขย่าเพื่ออ่านผลปฏิกิริยา แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ คอลัมน์ที่ใช้ในการทดสอบมีราคาแพง ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงเฉพาะที่ใช้สำหรับคอลัมน์ ใช้เวลาในการทดสอบนานเนื่องจากต้องมีการ incubate ตัวอย่างเลือดกับแอนติบอดีก่อนปั่นอ่านผลของปฏิกิริยา 5-15 นาที ขึ้นกับชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบ และสามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้เพียง 2-3 วัน เป็นต้น (9, 12, 31, 32)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination)

2.5.1 ความเข้มข้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody concentration)

ความเข้มข้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี มีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง อัตราส่วนที่มีความเหมาะสม (Equivalence zone) ในการเกิดปฏิกิริยา ส่งผลให้แอนติเจนและแอนติบอดีในระบบสามารถจับกันได้พอดีและเชื่อมต่อกันเป็นโครงร่างแบบตาข่าย (lattice formation) สามารถมองเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ prezone ปริมาณของแอนติเจนหรือเม็ดเลือดแดงมีน้อย แอนติบอดีในระบบมีเหลือ (antibody excess) และ postzone แอนติเจนในระบบมีมากเกินไป แอนติบอดีไม่สามารถจับกับแอนติเจนได้หมดจึงมีเม็ดเลือดแดงเหลือจากการทำปฏิกิริยา โดยทั้ง prezone และ postzone จะไม่เห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดผลลบปลอมในการทดสอบ สามารถแก้ไขโดยการเจือจางหรือลดปริมาณของแอนติบอดีในช่วงของ prezone และเพิ่มปริมาณของแอนติบอดีให้มากขึ้นในช่วงของ postzone เพื่อให้มีความเหมาะสมของปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีในระบบ ทำให้สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 6 (21)



รูปที่ 6 แสดงผลของความเข้มข้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดย (A) คือ prezone (B) Equivalence zone และ (C) postzone (21)

2.5.2 สภาวะความเป็นกรด-เบส (pH)

สภาวะความเป็นกรด-เบส ที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง สำหรับแอนติบอดีส่วนใหญ่ ได้แก่ pH ที่ 6.5 ถึง 7.5 และ pH โดยทั่วไปที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดใช้สำหรับทำการทดสอบ คือ pH ที่ 7.0 ซึ่งมีความเป็นกลาง ยกเว้นแอนติบอดีต่อแอนติเจนในหมู่เลือดบางระบบ เช่น anti-M ในระบบ MNS ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเมื่อทำการทดสอบที่ pH ต่ำกว่า 6.5 เป็นต้น (21, 29)

2.5.3 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของแอนติบอดีแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของ Immunoglobulin class แอนติบอดีชนิด IgM (cold antibody) จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 4-27 °C และแอนติบอดีที่เป็นชนิด IgG (warm antibody) จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นต้น (21, 29)

2.5.4 เวลาในการทำปฏิกิริยา (Incubation time)

การเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง จะต้องมีเวลาในการทำปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสม โดยจะต้องไม่มากหรือน้อยเกินไป เวลาในการทำปฏิกิริยาที่น้อยเกินไปอาจส่งผลให้ไม่เกิดการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี ในขณะที่การทำปฏิกิริยาที่นานเกินไปอาจส่งผลให้ antigen-antibody complex ที่จับกันอยู่แยกออก และการใช้สารเร่งปฏิกิริยา เช่น สารละลาย LISS จะช่วยดึงแอนติบอดีให้เข้ามาใกล้กับเม็ดเลือดแดงได้มากขึ้นจึงช่วยลดระยะเวลาในการเข้าสู่จุดสมดุล (equilibrium) ของแอนติเจนและแอนติบอดีได้ (21)

2.5.5 Immunoglobulin class

คุณสมบัติที่แตกต่างกันของแอนติบอดีในแต่ละ Immunoglobulin class มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง แอนติบอดีชนิด IgG จะมีลักษณะของโครงสร้างเป็น

monomer ที่มีขนาดกว้าง 250 °A ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ไม่ดี ในขณะที่แอนติบอดีชนิด IgM มีโครงสร้างทีเป็น pentamer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1000 °A มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าแอนติบอดีชนิด IgG ถึง 750 เท่า จากการที่สามารถเชื่อมพันธะระหว่างเม็ดเลือดแดงสองเซลล์ได้ง่ายกว่า ทั้งยังมี antigen binding sites ที่มากกว่า สามารถจับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดได้มากถึง 10 ตำแหน่ง ในขณะที่ IgG สามารถจับได้เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น (21, 29)

2.6 สารเร่งปฏิกิริยา (Enhancement media หรือ potentiators)

สารที่ใช้สำหรับการเร่งปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่

2.6.1 Low Ionic Strength Solution (LISS)

สารละลาย LISS โดยทั่วไปจะประกอบด้วย 0.2%NSS เป็นสารที่มีความเป็นประจุน้อยกว่าสารละลาย normal saline (0.9%NSS) มีความสามารถในการลด zeta potential ในปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ส่งผลให้โมเลกุลของแอนติบอดีที่มีประจุเป็นบวกและเม็ดเลือดแดงที่มีประจุเป็นลบเข้ามาอยู่ใกล้กันได้มากขึ้น LISS เป็นสารละลายที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด เนื่องจากช่วยเพิ่มอัตราการ sensitize ของแอนติบอดีกับเม็ดเลือดแดงได้ จึงช่วยลดเวลาในการทำปฏิกิริยาและสามารถใช้คู่กับสารละลาย albumin ได้ (21, 33)

2.6.2 Polyethylene glycol และ polybrene

Polyethylene glycol และ polybrene เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สามารถใช้ร่วมกับสารละลาย LISS ในการทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยช่วยให้เม็ดเลือดแดงเข้ามาอยู่ใกล้กันได้มากขึ้น สามารถเร่งการเกิดโครงร่างแบบตาข่าย (lattice formation) และการจับกลุ่ม

ของเม็ดเลือดแดงได้มากขึ้น มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่ดีกว่าการใช้สารละลาย albumin และสารละลาย LISS (12, 21)

2.6.3 Enzyme

Protease หรือ proteolytic enzyme ถูกนำมาใช้ในการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดตั้งแต่ปี ค.ศ. 1947 โดย Morton และ Picklee ที่ได้ใช้เอนไซม์ sialidase ที่สกัดได้จาก *Vibrio cholera* และเอนไซม์ trypsin จากกระเพาะของหมูซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถเร่งการปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ โดยเอนไซม์ protease จะย่อยโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์และปล่อยกรด sialic ออกมา ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีแอนติเจนของหมู่เลือดอยู่ถูกย่อยและคลายออก เกิดการการเรียงตัวเป็นเส้นตรงหรือ linear peptide sequence ช่วยลดความเป็นประจุลบของเม็ดเลือดแดงลงหรือช่วยลด zeta potential ตัวอย่างชนิดของเอนไซม์ที่นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ได้แก่ เอนไซม์ papain จากมะละกอ ficin จากพืช bromelin จากสับปะรด และ trypsin จากตับอ่อนของวัว การใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาจะต้องมีความระวังระวัง เนื่องจาก ไม่สามารถนำเอนไซม์มาใช้ได้กับการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดทุกชนิด โดยหมู่เลือดที่สามารถใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาได้ เช่น หมู่เลือดในระบบ Rh, Kidd, P1PK, Lewis และ I เป็นต้น แต่เอนไซม์จะไปทำลายปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในหมู่เลือดระบบ Duffy และ MNS เป็นต้น (19, 21, 34)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ

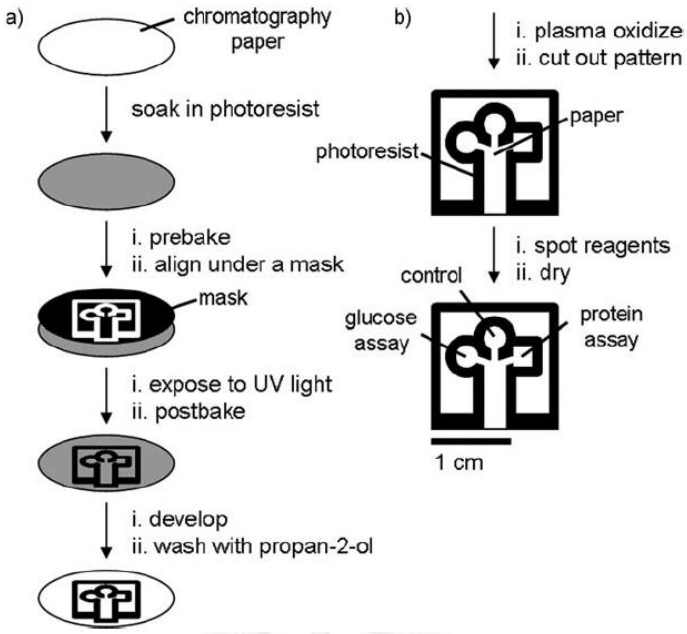
2.7.1 เทคนิคการสร้างลวดลายบนกระดาษเพื่อสร้างขอบเขตส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic)

อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ (Paper-based analytical device) ถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกโดยทีมนักวิจัยของมหาวิทยาลัย Harvard เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ใช้เทคนิค Lab-

on-paper เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีราคาถูก ใช้งานง่าย มีความรวดเร็วในการทดสอบ มีขนาดเล็ก ใช้ปริมาตรตัวอย่างเลือดและน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์น้อย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ ที่ทันสมัย ทั้งยังมีความสามารถในการพัฒนาเป็นอุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์ที่ข้างเตียงผู้ป่วยได้ (point of care testing, POCT) มีการสร้างลวดลายบนกระดาษเพื่อแบ่งพื้นที่ของกระดาษออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นส่วนที่ใช้เป็นบริเวณสำหรับทำปฏิกิริยาของสารและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นส่วนที่ใช้เป็นบริเวณสำหรับกั้นขอบเขตของท่อ (35, 36) เทคนิคต่างๆ ที่มีการนำมาใช้ในการสร้างลวดลายสำหรับสร้างอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ ได้แก่

1. Photolithography เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้การอุดกั้นรูพรุนของกระดาษโดยใช้สาร photoresist เคลือบ แล้ววางแม่แบบที่ต้องการสร้างลวดลายไว้ที่บนกระดาษแล้วนำไปฉายรังสี UV เพื่อให้เกิดการ cross-linked ส่วนของกระดาษที่ไม่ถูกแม่แบบบังไว้จะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จากนั้นนำกระดาษไปล้างส่วนที่ไม่เกิดการ cross-linked ออก สำหรับเป็นบริเวณส่วนของการทำปฏิกิริยาของสาร แสดงดังรูปที่ 7 วิธีนี้มีข้อดี คือ ท่อที่ใช้เป็นบริเวณสำหรับการทำปฏิกิริยาที่มีความคมชัด และข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ อุปกรณ์การใช้ในการสร้างลวดลายมีราคาแพง มีขั้นตอนในการล้าง un-crosslinked polymer ทำให้กระดาษมีการสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง มีความคงทนน้อย (35, 37)

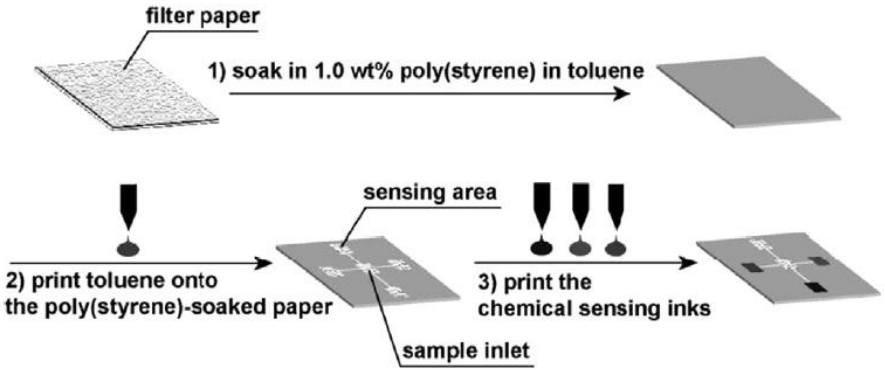
Chulalongkorn University



รูปที่ 7 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี Photolithography (35)

2. PDMS plotting เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยใช้หลักการการอุดกั้นรูพรุนของกระดาษโดยใช้สาร PDMS ที่ละลายใน hexanes เพื่อสร้างขอบเขตของบริเวณทีใช้ทำปฏิกิริยา (hydrophilic) และส่วนที่เป็นขอบเขตขอบท่อ (hydrophobic) ข้อดีของวิธีนี้คือ สาร PDMS มีราคาถูกและอุปกรณ์ที่สร้างขึ้นมีความยืดหยุ่นสามารถพับงอได้ แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ใช้เวลาในการสร้างลวดลายบนกระดาษนาน ไม่เหมาะกับการผลิตในปริมาณมากๆ (37, 38)

3. Ink Jet Etching เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการเคลือบกระดาษด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เช่น polystyrene และพิมพ์ลวดลายบนกระดาษด้วยตัวทำละลาย เช่น toluene เพื่อทำให้บริเวณลวดลายที่สร้างขึ้นนั้นมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic อีกครั้ง แสดงดังรูปที่ 8 ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ การที่ต้องใช้เครื่องพิมพ์ชนิดพิเศษ และบริเวณ hydrophilic ของลวดลายบนกระดาษจะสัมผัสกับสารเคมีโดยตรง (37, 39, 40)



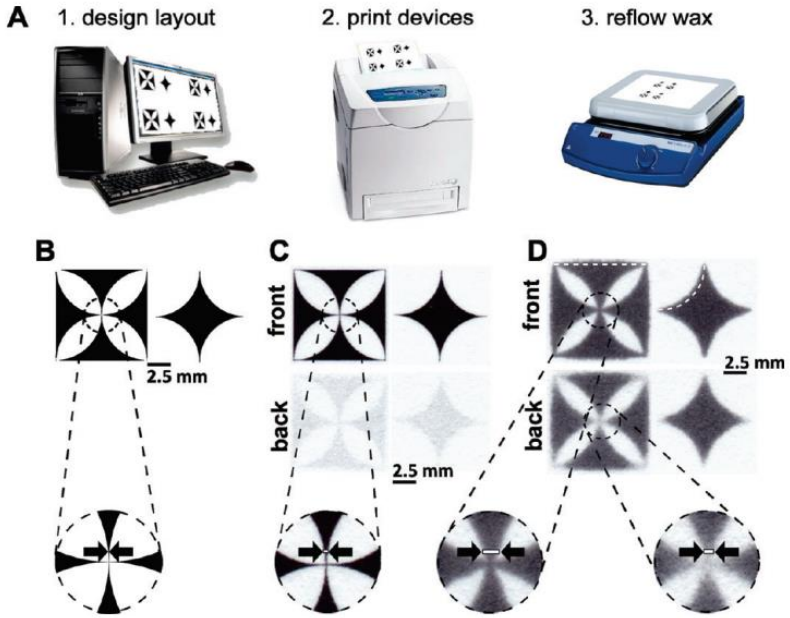
รูปที่ 8 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี Ink Jet Etching (40)

4. Plasma treatment เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยนำกระดาษมาเคลือบด้วยสารที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เช่น Alkyl ketene dimer (AKD) จากนั้นวางแม่แบบที่ต้องการสร้างลวดลายลงบนกระดาษ แล้วนำเข้าเครื่อง Plasma cleaner เพื่อสร้างบริเวณส่วนที่เป็น hydrophilic ข้อดีของวิธีนี้คือ สาร AKD มีราคาถูก แต่วิธีนี้จำเป็นต้องมีแม่แบบโลหะสำหรับการสร้างลวดลายหลายชิ้นเพื่อการสร้างลวดลายที่แตกต่างกันออกไปอีกทั้งกระดาษที่ใช้ทำปฏิกิริยาสัมผัสโดยตรงกับสารเคมีก่อนที่จะเข้าเครื่อง Plasma cleaner (37, 41)

5. Paper cutting เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการใช้คอมพิวเตอร์ในการควบคุมใบมีดเพื่อตัดกระดาษให้ได้ลวดลายตามที่ต้องการ ข้อดีของวิธีนี้คือ ขั้นตอนการผลิตมีความรวดเร็ว ทำให้ได้อุปกรณ์จำนวนมากในการผลิตแต่ละครั้ง แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัด คือ อุปกรณ์ที่ได้มีความคงทนน้อย และไม่มีขอบเขตส่วน hydrophilic และ hydrophobic ที่ชัดเจน ทำให้ควบคุมการไหลของสารได้ยาก (37, 42)

6. Wax printing เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการออกแบบลวดลายด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และพิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์แวกซ์ นำกระดาษที่พิมพ์ลวดลายแล้วไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงให้หมึกพิมพ์แวกซ์ละลายและซึมลงในเนื้อกระดาษเพื่อสร้างขอบเขตของการทำปฏิกิริยา

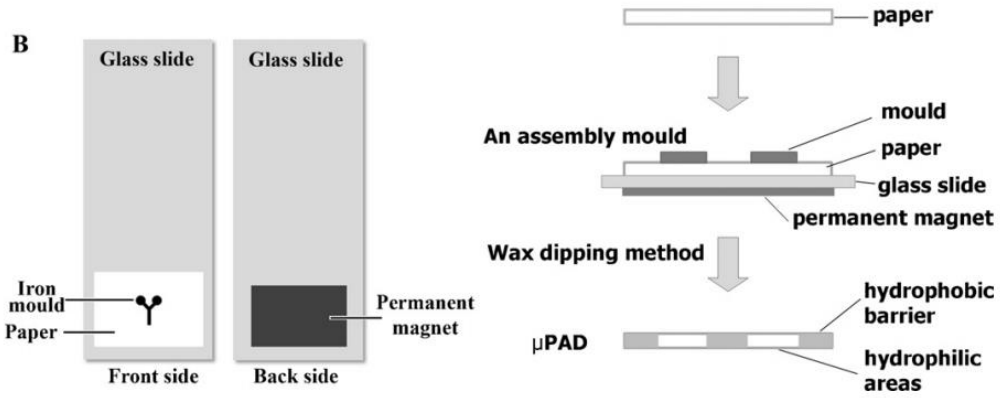
ของสาร แสดงดังรูปที่ 9 มีข้อดี คือ ราคาไม่แพง สามารถผลิตอุปกรณ์การตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็ว (43, 44) จึงทำให้ได้อุปกรณ์จำนวนมากในการผลิตแต่ละครั้ง แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ การต้องให้ความร้อนในอุณหภูมิที่สูงเพื่อหลอมละลายแวกซ์ให้ซึมลงในกระดาษเพื่อแบ่งเป็นส่วนของ hydrophilic และ hydrophobic สำหรับการทำปฏิกิริยาของสาร อีกทั้งขอบเขตของท่อที่ได้จากการสร้างลวดลายด้วยวิธีนี้มีความคมชัดน้อย



รูปที่ 9 แสดงตัวอย่างการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี wax printing (43)

7. Wax screen printing เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการออกแบบลวดลายที่ต้องการลงบนแผ่นสกรีนแล้วนำแผ่นสกรีนมาวางทาบลงบนกระดาษ จากนั้นใช้แวกซ์สกรีนลวดลายและนำไปให้ความร้อนจนแวกซ์ละลายและซึมลงในเนื้อกระดาษเพื่อสร้างขอบเขตของการทำปฏิกิริยา ข้อดีของวิธีนี้ คือราคาถูก และขั้นตอนในการผลิตทำได้ง่ายจึงทำให้ผลิตได้ครั้งละปริมาณมาก แต่ข้อจำกัดคือ ลวดลายที่ได้มีความคมชัดน้อย และต้องใช้แผ่นสกรีนสำหรับการสร้างลวดลาย (37, 45)

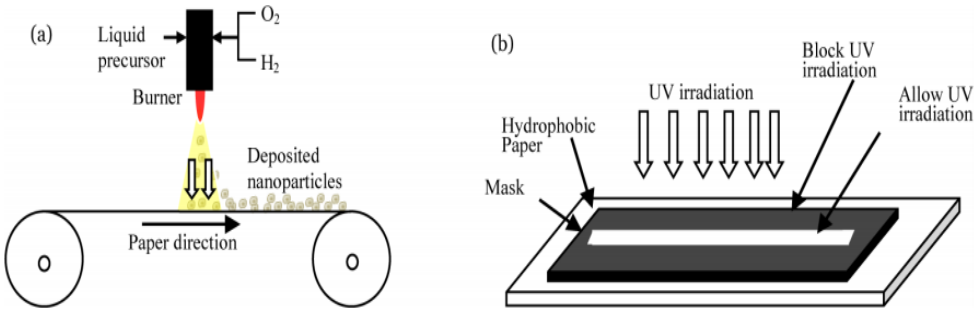
8. Wax dipping เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการนำแม่แบบที่เป็นเหล็กประกบบนกระดาษแล้วรองด้วยแผ่นสไลด์แก้วและยึดด้วยแม่เหล็กที่ด้านหลัง แล้วนำไปจุ่มลงในแวกซ์ที่หลอมละลายในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นแกะกระดาษออกจากแผ่นสไลด์แก้ว บริเวณที่ถูกแม่แบบปิดทับอยู่จะเป็นส่วน hydrophilic และบริเวณรอบนอกแวกซ์ จะซึมเข้าไปเกิดเป็นส่วน hydrophobic แสดงดังรูปที่ 10 ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีราคาถูก ขั้นตอนในการผลิตไม่ซับซ้อน แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องรักษาอุณหภูมิของแวกซ์ที่หลอมละลายให้คงที่ตลอดขั้นตอนการสร้างแบบลวดลาย (46)



รูปที่ 10 แสดงการสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี wax dipping (46)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

9. Roll-to-roll liquid flame spray technique (LFS) เป็นวิธีการสร้างลวดลายบนกระดาษโดยการเคลือบกระดาษด้วย TiO_2 nanoparticle จากนั้นนำแผ่นที่ออกแบบลวดลายที่พิมพ์ด้วยหมึก silver nanoparticle มาปิดลงบนกระดาษ แล้วนำไปฉายรังสี UV บริเวณที่โดนรังสี UV จะคุณสมบัติเป็น hydrophilic และส่วนที่ไม่โดนรังสี UV จะเป็นส่วนของ hydrophobic แสดงดังรูปที่ 11 (47)



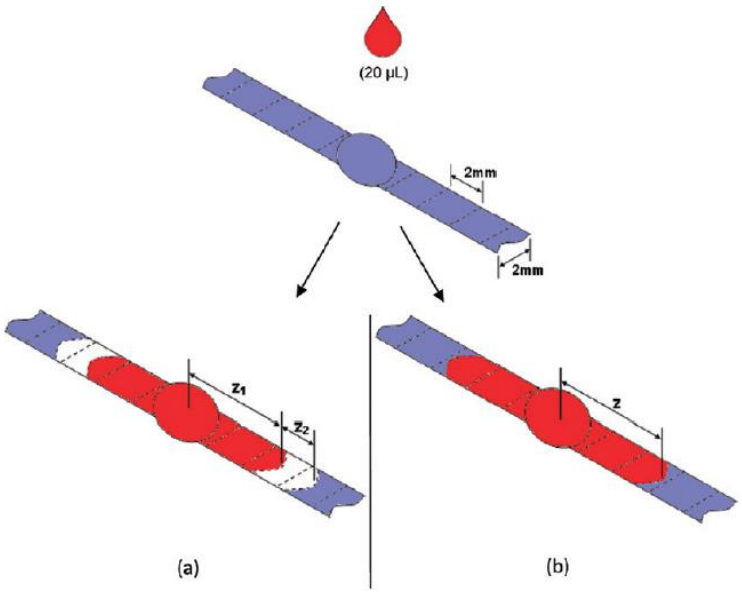
รูปที่ 11 การสร้างลวดลายบนกระดาษด้วยวิธี LFS (47)

2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษสำหรับการตรวจหมู่เลือด

การตรวจวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ฐานกระดาษเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารชีวภาพต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย รวมทั้งการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ สำหรับการตรวจวิเคราะห์และติดตามการรักษาโรคในผู้ป่วย เช่น การนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับกลูโคส เอนไซม์ aminotransferase (AST) เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และ urine creatinine รวมทั้งการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) เป็นต้น (47-52)

ในปี ค.ศ. 2010 Mohidus Samad Khan และคณะ ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) บนกระดาษ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 อาศัยหลักการปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ร่วมกับหลักการโครมาโทกราฟี (chromatographic assay) ที่ได้ออกแบบให้มีบริเวณสำหรับหยดตัวอย่างเลือดอยู่ตรงกลางและมีท่อด้านข้างทั้งสองฝั่งเพื่อตรึงแอนติบอดี ชะตัวอย่างเลือดด้วยบัฟเฟอร์ให้เม็ดเลือดแดงเคลื่อนที่ออกไปในท่อ ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ให้ผลบวกและให้ผลลบ โดยที่ผลบวก เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มและเคลื่อนที่ได้ในระยะทางสั้น ส่วนของพลาสมาจะแยกออก

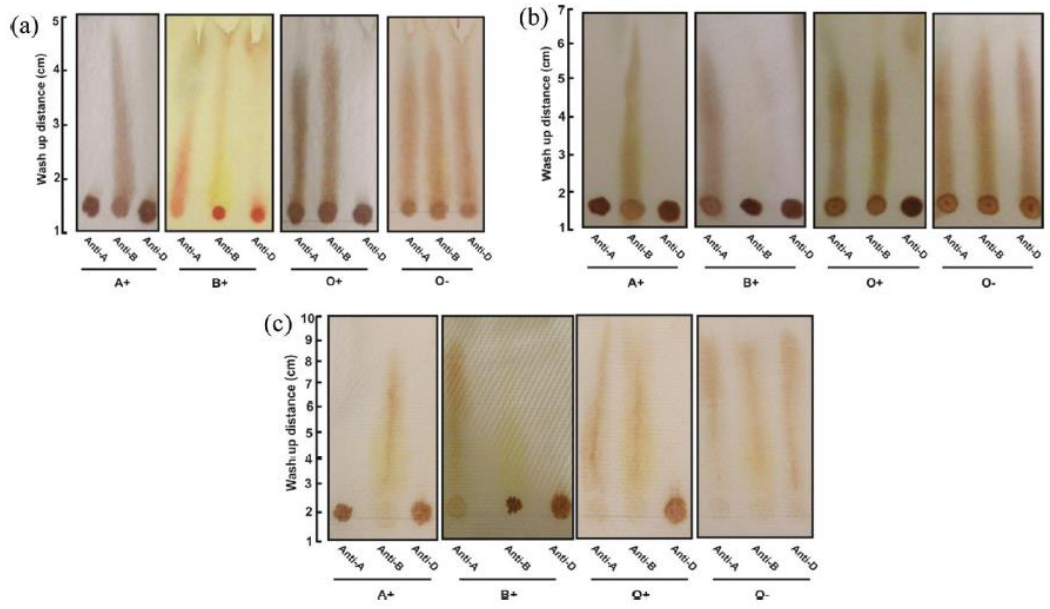
และไหลไปตามท่อทั้งสองฝั่งอย่างชัดเจน ส่วนผลลบ เม็ดเลือดแดงจะไม่จับกลุ่มและเคลื่อนที่เข้าไปในท่อทั้งสองฝั่งได้ในระยะทางที่ไกลกว่า และพลาสมาไม่เกิดการแยกส่วนหรือเกิดการแยกส่วนในระยะทางที่สั้นกว่าเม็ดเลือดแดงที่ให้ผลบวก แสดงดังรูปที่ 12 (53)



รูปที่ 12 แสดงการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้หลักการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงบนกระดาษ a) แสดงรูปผลการทดสอบหมู่เลือดที่เกิดการจับกลุ่ม b) แสดงรูปผลการทดสอบหมู่เลือดที่ไม่เกิดการจับกลุ่ม (53)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Mohammad Al-Tamimi และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) โดยนำเทคนิค paper-based assay มาประยุกต์ใช้ ซึ่งได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการอ่านผลและแปลผลหมู่เลือดในกระดาษชนิดต่างๆ ได้แก่ กระดาษซับ (blotting paper) กระดาษกรอง (filter paper) และกระดาษชำระ (Kleenex paper) ทำการทดสอบโดยการหยด anti-A, anti-B และ anti-D ลงบนกระดาษที่จุดเริ่มต้น และหยดตัวอย่างเลือดลงไปที่ตรงกลางของหยดแอนติบอดี ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา แล้วนำกระดาษไปจุ่มลงในบัฟเฟอร์เพื่อชะปฏิกิริยา เม็ดเลือด

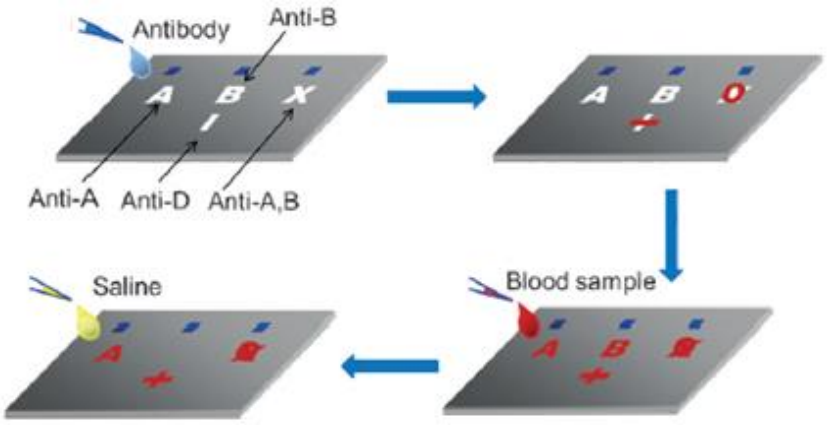
แดงในตัวอย่างเลือดที่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีจะเกิดการจับกลุ่มอยู่ในบริเวณที่หยดตัวอย่างเลือดอย่างชัดเจน ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกันจะไม่เกิดการจับกลุ่มและถูกชะออกด้วยบัฟเฟอร์ ไหลไปตามแรง capillary force บนกระดาษ จากนั้นวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดงที่ถูกชะ เพื่อเปรียบเทียบหาชนิดของกระดาษที่ให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนที่สุด แสดงดังรูปที่ 13 (10)



รูปที่ 13 การทดสอบหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) โดยใช้กระดาษชนิดต่างๆ a) กระดาษซับ b) กระดาษกรอง c) กระดาษชำระ (10)

ในปี ค.ศ. 2012 Miaosi Li และคณะ ได้พัฒนาอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ของไหลจุลภาคฐานกระดาษสำหรับการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ชนิดที่สามารถรายงานผลเป็นตัวอักษรตามหมู่เลือด โดยออกแบบให้มีบริเวณสำหรับหยดตัวอย่างเลือดเป็นตัวอักษรตามหมู่เลือด คือ A, B และ O จากนั้นตรึงแอนติบอดีโดยตรึง anti-A ลงในตัวช่องตัวอักษร A และตรึง anti-B ลงในตัวช่องตัวอักษร B สำหรับตัวอักษร O พิมพ์ด้วยหมึกพิมพ์ที่ไม่ละลายน้ำและพิมพ์สัญลักษณ์ X ทับลงไปบน

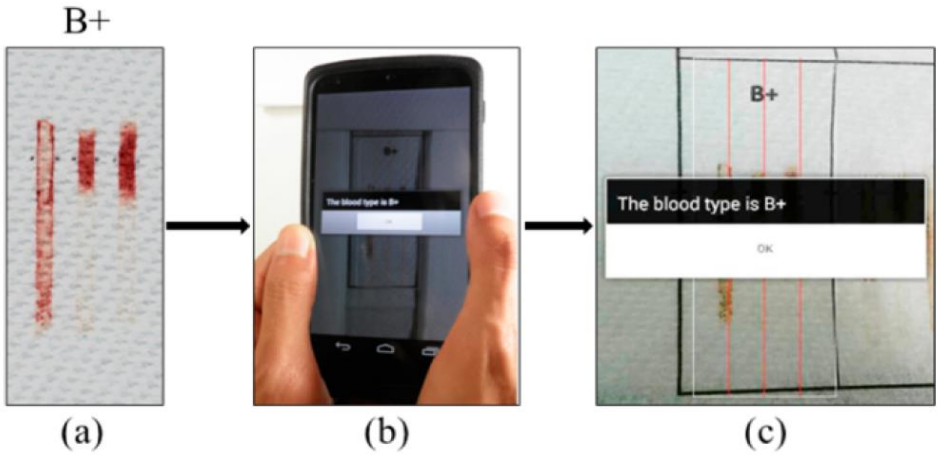
ตัวอักษร O เพื่อเป็นบริเวณสำหรับหยดตัวอย่าง และหมู่ Rh (D) จะพิมพ์สัญลักษณ์ - ด้วยหมึกพิมพ์ที่ไม่ละลายน้ำและพิมพ์สัญลักษณ์ I ทับลงไปเพื่อเป็นบริเวณสำหรับหยดตัวอย่าง หากเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ตรึงไว้ เมื่อล้างด้วย normal saline เม็ดเลือดแดงจะไม่ถูกชะออกและจะแสดงหมู่เลือดตามตัวอักษรนั้น คือ ตัวอักษร A, B และ O แล้วจึงแปลผลของหมู่เลือดด้วยตัวอักษรต่างๆ เช่น หมู่เลือด A จะแสดงผลเป็นตัวอักษร A หมู่เลือด AB จะแสดงผลเป็นตัวอักษร A และตัวอักษร B เป็นต้น สำหรับหมู่เลือด Rh (D) หากเกิดการจับกลุ่ม จะแสดงเป็นสัญลักษณ์ + แสดงถึง หมู่เลือด Rh (D) ที่เป็นบวก หรือ positive และหากไม่เกิดการจับกลุ่ม จะแสดงเป็นสัญลักษณ์ – แสดงถึงหมู่เลือด Rh (D) ที่เป็นลบ หรือ negative ดังแสดงในรูปที่ 14 (11)



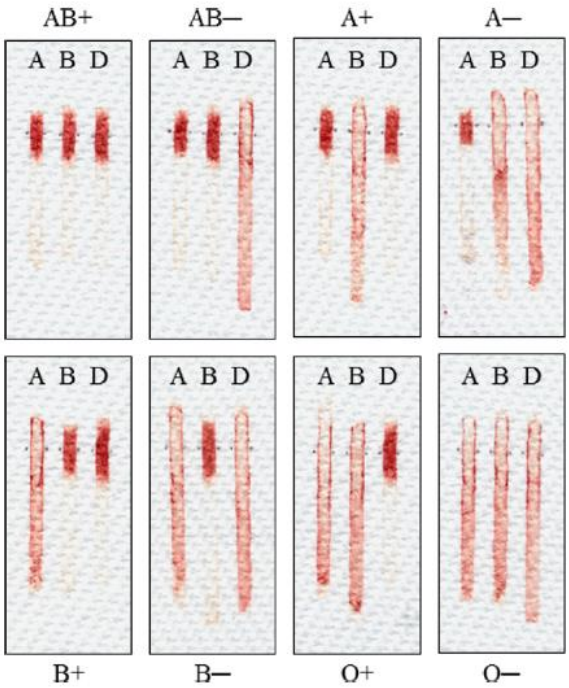
รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้การรายงานผลเป็นตัวอักษร (11)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 ได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ที่สะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น โดย Linyun Guan และคณะ ได้นำเทคนิค paper-based assay มาประยุกต์ใช้และออกแบบอุปกรณ์การตรวจให้มีลวดลายที่เป็นแท่งคล้ายบาร์โค้ดด้วยเทคนิคการพิมพ์ด้วย Alkyl ketone dimer สำหรับกั้นกระดาษให้เป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ตรึง anti-A, anti-B และ anti-D ลงในช่อง bar channel และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงด้วย NaAlg หยด

ตัวอย่างเลือดลงในช่องทดสอบ และชะปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยบัฟเฟอร์ ถ่ายรูปผลการทดสอบ อ่านผล และแปลผลการทดสอบหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D ที่ได้ด้วยโปรแกรมมือถือสมาร์ทโฟนที่ได้ออกแบบไว้ ดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16 (54)

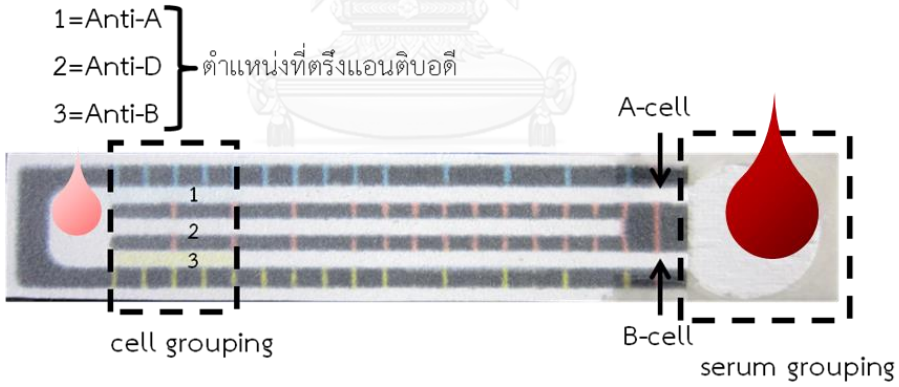


รูปที่ 15 แสดงการอ่านผลและแปลผลการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้โปรแกรมที่พัฒนาขึ้นในโทรศัพท์มือถือสมาร์ทโฟน (54)

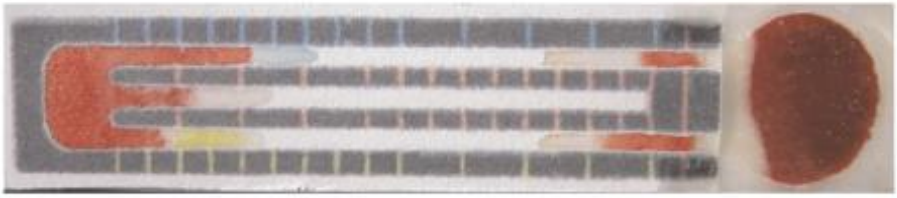


รูปที่ 16 แสดงรูปแบบของผลการทดสอบหมู่เลือด ABO และ Rh (D) แบบบาร์โคด (54)

นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2014 Noiphung J. และคณะ ได้พัฒนา paper-based device สำหรับการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) ให้มีการใช้งานที่ง่ายและสะดวก โดยออกแบบให้สามารถตรวจได้ cell และ serum grouping ในแผ่นเดียวกัน สำหรับการทดสอบ cell grouping เจือจางตัวอย่างเลือดและหยดลงไปในบริเวณสำหรับหยดตัวอย่างให้ไหลเข้าไปในท่อทดสอบที่ได้ตรึง anti-A, anti-B และ anti-D ไว้ และส่วนของการทดสอบ serum grouping หยดตัวอย่างเลือดครบส่วนลงบนกระดาษแยกเลือด เพื่อให้พลาสมาแยกและไหลเข้าสู่ท่อทดสอบ แล้วหยด A-cell และ B-cell ลงไป อ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงโดยคำนวณอัตราส่วนระยะทางการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดงในท่อเปรียบเทียบกับระยะทางในการเคลื่อนที่ของซีรัม ดังแสดงในรูปที่ 17 และ รูปที่ 18 (55)



รูปที่ 17 แสดงการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) โดยใช้หลักการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ออกแบบให้สามารถตรวจได้ทั้ง cell grouping และ serum grouping พร้อมกัน (55)



รูปที่ 18 แสดงผลการตรวจหมู่เลือด B และ Rh (D) positive ในตัวอย่างเลือดโดยตรวจทั้ง cell grouping และ serum grouping พร้อมกันด้วยอุปกรณ์ paper-based device (55)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด จำนวน 50 ตัวอย่าง โดย 37 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเลือดเหลือ จากผู้บริจาคโลหิตที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันโรคทรวงอก จ.นนทบุรี และใส่สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA โดยการใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิต งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมเพื่อการวิจัยสถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 043/2559 และตัวอย่างเลือดอีก 13 ตัวอย่างเตรียมจากชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) Lot No. 58100, 58110, 58120, 59020, 59030 และ 59040 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแอนติเจนที่หายาก เช่น แอนติเจน K+, R_2R_2 (D+ C- E+ c+ และ e-), r'r (D- C+ E- c+ และ e+) และ rr (D- C- E- c+ และ e+) เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

1) โมโนโคลนอลแอนติบอดี ชนิด IgM จากบริษัท CE-immunodiagnstika GmbH ประเทศเยอรมนี ได้แก่ anti-D โคลน RUM-1 titer 1:128, anti-K โคลน MS56 titer 1:32, anti-C โคลน MS273 titer 1:32, anti-E โคลน MS12/MS260 titer 1:32, anti-c โคลน MS35 titer 1:32, anti-e โคลน MS62/MS69 titer 1:32, anti-P_1 โคลน 650 titer 1:8, anti-Jk^a โคลน MS15 titer 1:4 และ anti-Jk^b โคลน MS8 titer 1:4

2) Analytical grade sodium chloride (NaCl), bovine serum albumin (BSA) จากบริษัท Sigma-Aldrich สหรัฐอเมริกา modified LISS และ modified enzyme bromelin จากบริษัท Bio-Rad สหรัฐอเมริกา

3) กระดาษกรองเบอร์ 4 จากบริษัท Whatman International ประเทศอังกฤษ เครื่องพิมพ์และหมึกพิมพ์แวกซ์ Color Qube 8570 Xerox ประเทศญี่ปุ่น hot plate C-MAG HS7 IKA สหรัฐอเมริกา เครื่องปั่นเหวี่ยง Diacent-12 Bio-Rad สหรัฐอเมริกา และเครื่องสแกน CanoScan Canon LiDE 120 ประเทศญี่ปุ่น

3.3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การออกแบบและสร้างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

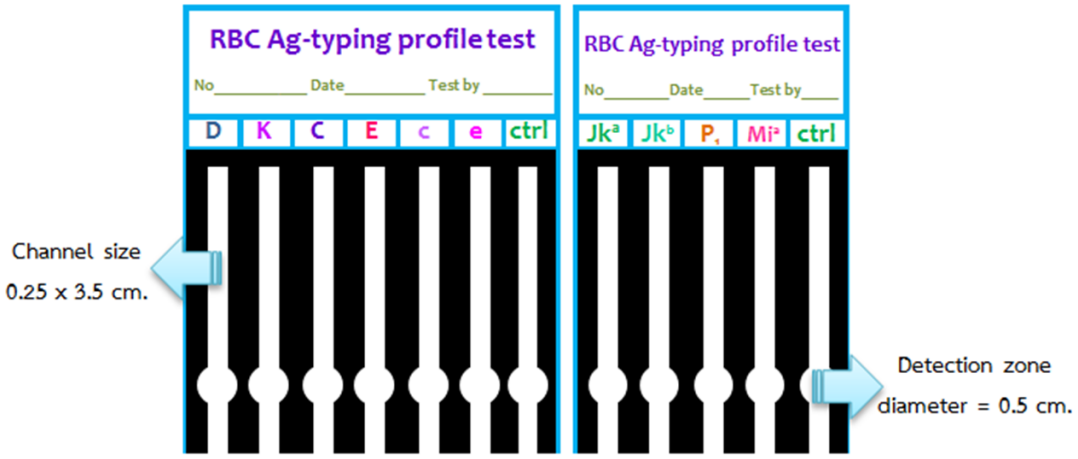
3.3.1.1. ออกแบบชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่ต้องการด้วยโปรแกรม Microsoft word 2010 ให้มีท่อตรงทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า (Channel area: C) ที่มีปลายเปิดด้านล่าง ขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร x 3.5 เซนติเมตร จำนวนท่อตามใช้งานในแต่ละ PADs ดังนี้ 1) PADs 1 สามารถตรวจแอนติเจนได้ทั้งหมด 6 ชนิดพร้อมกัน คือ แอนติเจน D, K, C, E, c และ e มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 4.5 เซนติเมตร x 3.7 เซนติเมตร 2) PADs 2 สามารถตรวจแอนติเจนได้ทั้งหมด 3 ชนิดพร้อมกัน คือ แอนติเจน Jk^a, Jk^b และ P_1 มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2.7 เซนติเมตร x 3.7 เซนติเมตร 3) PADs 3 มีจำนวนท่อทั้งหมด 10 ท่อ สามารถตรวจแอนติเจนได้ทั้งหมด 9 ชนิดพร้อมกัน คือ แอนติเจน D, K, C, E, c, e, Jk^a, Jk^b และ P_1 มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 5.5 เซนติเมตร x 3.7 เซนติเมตร และ 4) PADs 4 มีจำนวนท่อทั้งหมด 9 ท่อ สำหรับการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 4.9 เซนติเมตร x 3.7 เซนติเมตร โดยแต่ละท่อได้ออกแบบให้มีบริเวณทดสอบ (Detection zone: D) ที่มีลักษณะเป็น

วงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร อยู่สูงเหนือขึ้นมาจากปลายท่อด้านล่าง 6 มิลลิเมตร สำหรับตรึงแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบแต่ละชนิดและท่อสุดท้ายตรึงด้วย 6%BSA (w/v) ในสารละลาย PBS pH 7.4 สำหรับ control cells (autocontrol)

3.3.1.2 พิมพ์แบบลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ด้วยเทคนิค wax printing โดยใช้เครื่องพิมพ์ Xerox Color Qube 8570 แล้วนำไปให้ความร้อนด้วย hot plate ที่อุณหภูมิ 150 °C นาน 2 นาทีเพื่อให้หมึกพิมพ์ wax ละลายและซึมจากด้านบนลงไปด้านล่างของแผ่นกระดาษ เกิดการแข็งตัวและกั้นกระดาษออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เกิดเป็นท่อที่มีขอบเขตตามที่ได้ออกแบบไว้สำหรับเป็นพื้นที่ในการทำปฏิกิริยาในการทดสอบ

3.3.1.3 ติดด้วยเทปใสที่ด้านหลังให้เรียบทั่วทั้งแผ่น ระวังไม่ให้มีฟองอากาศ เพื่อให้สารสามารถไหลอยู่ในท่อได้โดยไม่ซึมลงไปด้านล่างของกระดาษและไหลได้เรียบสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น จากนั้นติดเทปกาว 2 หน้าแบบบางที่ขอบกระดาษทั้ง 2 ด้าน แล้วนำไปติดลงบนกรอบชุดทดสอบที่เป็นกระดาษแข็ง 180 แกรม ที่มีชื่อของชุดทดสอบ หมายเลขตัวอย่างเลือดที่ทำการทดสอบ วันที่และชื่อของผู้ทำการทดสอบ พร้อมทั้งชื่อชนิดของแอนติเจนต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการทวนสอบ และชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs สำหรับตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงบนกระดาษ PADs 1 และ 2 ที่เสร็จเรียบร้อย แสดงในรูปที่ 19

Chulalongkorn University



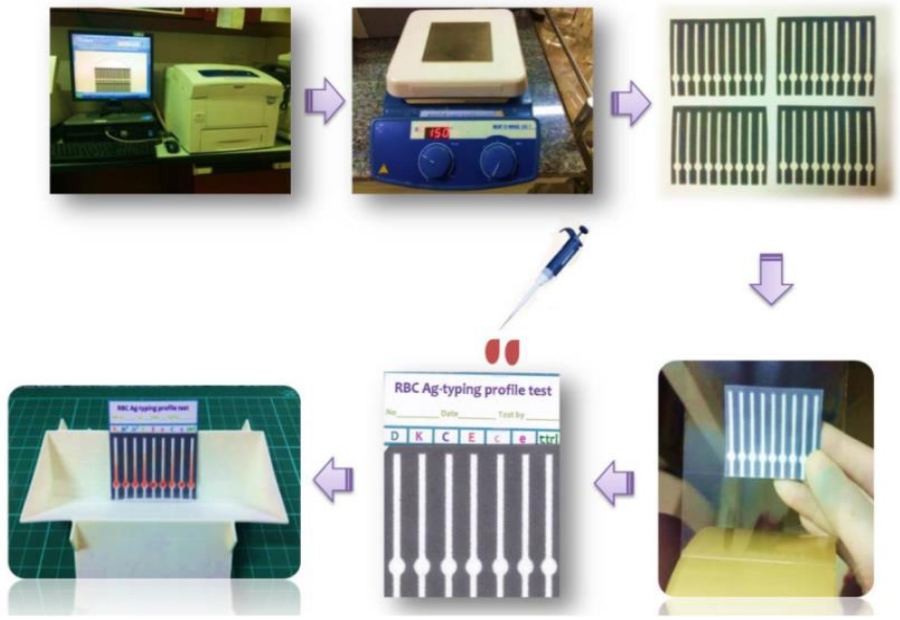
รูปที่ 19 แสดงตัวอย่างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs 1 และ 2

3.3.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

เนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบมีความแรง (titer) ที่ไม่เท่ากัน และแอนติเจนของหมู่เลือดชนิดต่างๆ มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในแต่ละคู่จึงมีความแตกต่างกันไปด้วย การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงใช้ anti-E (titer 1:32) เป็นตัวแทนของแอนติบอดีในกลุ่มที่มีความแรงมาก (anti-D titer 1:128 anti-C, E, c, e และ K titer 1:32) และใช้ anti-P_1 (titer 1:8) เป็นตัวแทนของแอนติบอดีในกลุ่มที่มีความแรงน้อย (anti-P_1 titer 1:8, anti-Jk^a และ JK^b titer 1:4)

เริ่มต้นสภาวะในการทดสอบสำหรับ RBC Ag-typing profile PADs โดยใช้ PADs แบบที่ 4 (9 ท่อ) และตรึง anti-E ปริมาตร 1 ไมโครลิตรลงในบริเวณทดสอบ (Detection zone: D) ของท่อที่ 1, 2, 4, 5, 7 และ 8 ส่วนท่อที่ 3, 6 และ 9 ตรึงด้วย 6%BSA (w/v) ในสารละลาย PBS pH 7.4 สำหรับเป็น negative control ในการทดสอบ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเตรียมตัวอย่างเลือด 20%RBCs (เซลล์ที่มีแอนติเจน E+ และ E-) ในสารละลาย modified LISS ที่เตรียม

จากชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) หยดตัวอย่างเลือดแอนติเจน E+ ลงในบริเวณทดสอบของท่อที่ 1, 4 และ 7 และแอนติเจน E- ในท่อที่ 2, 3, 5, 6, 8 และ 9 ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 1 นาที เมื่อครบเวลานำไปวางในถาดพลาสติก (reagent reservoir) ที่มีสารละลาย normal saline (0.9%NSS w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อชะปฏิกิริยา ทิ้งให้สารละลาย 0.9%NSS ไหลจากปลายท่อด้านล่างขึ้นไปผ่านบริเวณทดสอบจนถึงปลายท่อด้านบน นำ PADs ออกมาซับปลายด้านล่างด้วยกระดาษชำระให้แห้ง อ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ได้ด้วยตาเปล่า ผลบวกเม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกันกับแอนติบอดี จะเกิดการจับกลุ่มในบริเวณทดสอบและไม่ถูกชะให้หลุดออก ส่วนผลลบ เม็ดเลือดแดงที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกันกับแอนติบอดี จะถูกชะจากบริเวณทดสอบด้วย PBS ออกไปในท่อด้านบน ทำการทดสอบกับ anti-P_1 เช่นเดียวกับ anti-E โดยใช้เซลล์ที่มีแอนติเจน P_1+ และ P_1- ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 แสดงขั้นตอนการสร้างชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs และการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือด

3.3.2.1 การทดสอบหาสารละลายที่เหมาะสมในการชะปฏิกิริยา

ทำการทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย RBC Ag-typing profile PADs ตามสภาวะเริ่มต้น และชะปฏิกิริยาด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ 0.9%NSS (w/v) สารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 และสารละลาย modified LISS คัดเลือกสารละลายที่ใช้ในการชะปฏิกิริยาสำหรับชุดทดสอบที่ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุดโดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอม สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นตอน 3.3.2.2 ต่อไป

3.3.2.2 การทดสอบหาชนิดของสารเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด

ทำการทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่างเลือด 20%RBCs ในสารเจือจางที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS (w/v) สารละลาย modified LISS และสารละลาย modified enzyme bromelin นำมาทำการทดลองกับชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs โดยชะปฏิกิริยาด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบในขั้นตอน 3.3.2.1 คัดเลือกสารเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือดที่ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุดโดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอม สำหรับใช้ในการทดสอบขั้นตอน 3.3.2.3 ต่อไป

3.3.2.3 การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ทำการทดสอบโดยการเตรียมตัวอย่างเลือด 20%RBCs ในสารเจือจางที่มีความเหมาะสมที่ได้จากการทดสอบในขั้นตอน 3.3.2.2 นำมาทำการทดลองโดยให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ในเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที ชะปฏิกิริยาด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบในขั้นตอน 3.3.2.1 คัดเลือกเวลาที่สั้นที่สุดในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบ

Chulalongkorn University

มีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุด โดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอมสำหรับใช้ในการทดสอบขั้นตอน 3.3.2.4 ต่อไป

3.3.2.4 การทดสอบหาปริมาตรของแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมที่ใช้ตรึงบนชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

ทำการทดสอบหาปริมาตรของแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมโดยการตรึงแอนติบอดี ปริมาตร 1, 2 และ 3 ไมโครลิตร โดยตรึงแอนติบอดีครั้งละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเพิ่มปริมาตรแอนติบอดีเป็น 2 และ 3 ไมโครลิตรตามลำดับ แต่ละครั้งห่างกัน 10 นาที นำมาทำการทดลองกับชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs โดยใช้สภาวะต่างๆ ที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วจากข้อ 3.3.2.1 – 3.3.2.3 คัดเลือกแอนติบอดีปริมาตรน้อยที่สุดในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุด โดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอมสำหรับใช้ในการทดสอบขั้นตอน 3.3.2.5 ต่อไป

3.3.2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้น 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลายที่มีความเหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบจากขั้นตอน 3.2.2.2 นำมาทำการทดลองกับชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs โดยใช้สภาวะต่างๆ ที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วจากข้อ 3.3.2.1 – 3.3.2.4 คัดเลือกความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่น้อยที่สุดในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุด โดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอมสำหรับใช้ในการทดสอบขั้นตอน 3.3.3 ต่อไป

เมื่อได้สภาวะที่มีความเหมาะสมในเบื้องต้นสำหรับการทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มและไม่จับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs แล้ว นำมาทำการทดลอง

Chulalongkorn University

เช่นเดียวกันกับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ คือ anti-D, K, C, c, e, Jk^a และ Jk^b โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับ anti-E และ anti-P_1 จากนั้นนำผลการทดสอบทั้งหมดที่ได้มาคัดเลือกหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ง่าย ผลบวกและผลลบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากที่สุด โดยไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของหมู่เลือดต่างๆ ในตัวอย่างเลือดได้พร้อมกันทุกชนิดในขั้นตอนที่ 3.3.3 ต่อไป

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs เปรียบเทียบกับวิธีหลอดมาตรฐานทดลอง

ทำการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่ใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA และตัวอย่างเลือดที่เตรียมจากชุดเซลล์ ทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง ดังนี้

3.3.3.1 การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในขั้นตอนที่ 3.3.2.2 อ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่าและวัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพ (pixel intensity detection) ในบริเวณทดสอบ (Detection zone: D) และในบริเวณของท่อส่วนบน (Channel area: C)

1) การอ่านและแปลผลการทดสอบปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า

ผลบวก (positive) เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่ม แผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด แสดงว่า เม็ดเลือดแดงมีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ

ผลลบ (negative) เม็ดเลือดแดงไม่เกิดการจับกลุ่มและถูกชะให้ไหลออกไปในท่อ บริเวณทดสอบและท่อส่วนบนมีสีแดงจาง แสดงว่า เม็ดเลือดแดงไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ

Chulalongkorn University

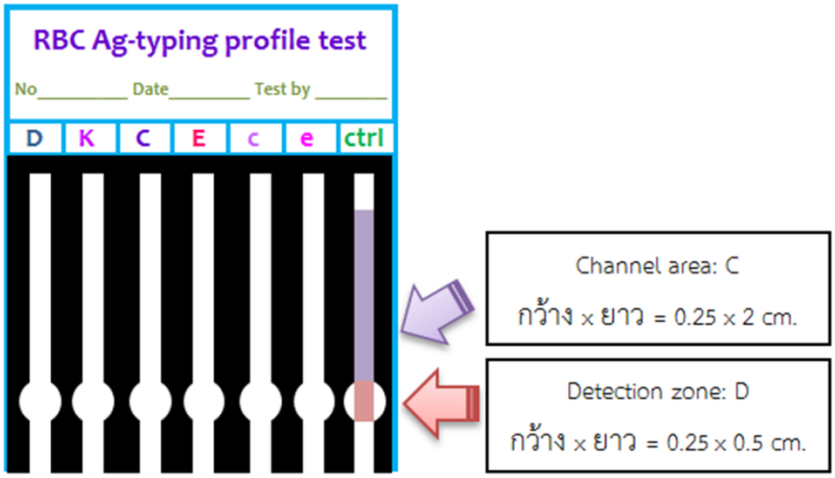
2) การอ่านผลและแปลผลด้วยการตรวจวัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพ (pixel intensity detection)

2.1 เมื่อทำการตรวจแอนติเจนของหมู่เลือดในตัวอย่างและอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่าแล้ว ทิ้งชุดตรวจ RBC Ag-typing profile PADs ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที นำชุดทดสอบสแกนเก็บภาพด้วยเครื่องสแกน CanoScan Canon LiDE 120 นำภาพที่ได้มาตรวจวัดค่าความเข้มแสงเฉลี่ย ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J โดยใช้ RGB color Mode วัดค่าเฉลี่ยในบริเวณทดสอบ (Detection zone: D) โดยกำหนดขนาดพื้นที่ในการวัดให้มีขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร x 5 มิลลิเมตร และในบริเวณของท่อส่วนบน (Channel area: C) กำหนดพื้นที่วัดจากบริเวณที่เหนือช่องทดสอบขึ้นไปยังปลายท่อส่วนบน มีขนาดกว้าง 2.5 มิลลิเมตร x ยาว 2 เซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 21 ถ้ามีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง มองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นสีแดงเข้ม วัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพจะได้ค่าต่ำ ในทางตรงข้าม บริเวณที่ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง จะเห็นเป็นสีแดงจาง วัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพจะได้ค่าสูง

2.2) คำนวณความแตกต่างของความเข้มแสงเฉลี่ยของภาพทั้งสองบริเวณ (different intensity: C-D) คือ บริเวณทดสอบ (Detection zone: D) และบริเวณท่อส่วนบน (Channel area: C) สำหรับเซลล์ที่มีแอนติเจนบวกชนิด homozygous และ heterozygous และเซลล์ที่มีแอนติเจนลบ นำมาคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยทดสอบการแจกแจงของข้อมูล (Tests of Normality) ด้วย descriptive statistics Shapiro-Wilk ($n<50$) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความแตกต่างค่าความเข้มแสงเฉลี่ยของภาพทั้งสองบริเวณ (different intensity: C-D) ระหว่างเซลล์ที่มีแอนติเจนบวกชนิด homozygous กับเซลล์ที่มีแอนติเจนลบ และเซลล์ที่มีแอนติเจนบวกชนิด heterozygous กับเซลล์ที่มีแอนติเจนลบ โดยใช้

Chulalongkorn University

compared mean independent sample t-test กำหนดระดับความเชื่อมั่น (confidence interval) = 99% ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ SPSS version 16.0



รูปที่ 21 แสดงบริเวณในการตรวจวัดค่าความเข้มแสงเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J

3.3.3.2 การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ทำตามเอกสารกำกับน้ำยาดังนี้ หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดี 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองและหยดเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 3-5%RBCs ใน Modified LISS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไปแล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5-15 นาที เมื่อครบเวลาปั่นอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

3.3.3.3 เปรียบเทียบผลตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ได้จากชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs กับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง โดยพิจารณาค่าร้อยละของความถูกต้องที่ได้จากการทดสอบในแอนติบอดีแต่ละชนิด คำนวณตามสูตรดังนี้ ร้อยละของความถูกต้อง (%accuracy) = [(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)] x 100 โดย TP คือ True positive หมายถึง ค่าของผลบวกจริง TN

คือ True negative หมายถึง ค่าของผลลบจริง FN คือ false negative หมายถึง ค่าของผลลบปลอม FP คือ false positive หมายถึง ค่าของผลบวกปลอม

3.3.4 การทดสอบความคงตัวของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

3.3.4.1 เตรียมชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs โดย PADs 1 ตรึงด้วย anti-D, K, C, E, c และ e ส่วนใน PADs 2 ตรึงด้วย anti-Jk^a, Jk^b และ P_1 และตรึง 6%BSA ในช่องสุดท้ายสำหรับ control cells นำไปใส่ในถุงสุญญากาศและซีลปิดปากถุงให้เรียบร้อย ใส่ในถุงฟรอยด์ที่มีซิปล็อคและมีสารดูดความชื้น นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 1-6 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน เมื่อครบเวลา นำชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่เก็บไว้มาทดสอบกับตัวอย่างเลือดจากชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) ที่ทราบชนิดของแอนติเจนแล้วครั้งละ 5 ตัวอย่าง ที่ครอบคลุมแอนติเจนทุกชนิด ได้แก่ เซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous ชนิด heterozygous และเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน อ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจนที่ทดสอบด้วยตาเปล่าและตรวจสอบความถูกต้องของผลการทดสอบที่ได้กับผลของแอนติเจนแต่ละชนิดในตาราง panel cells

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4

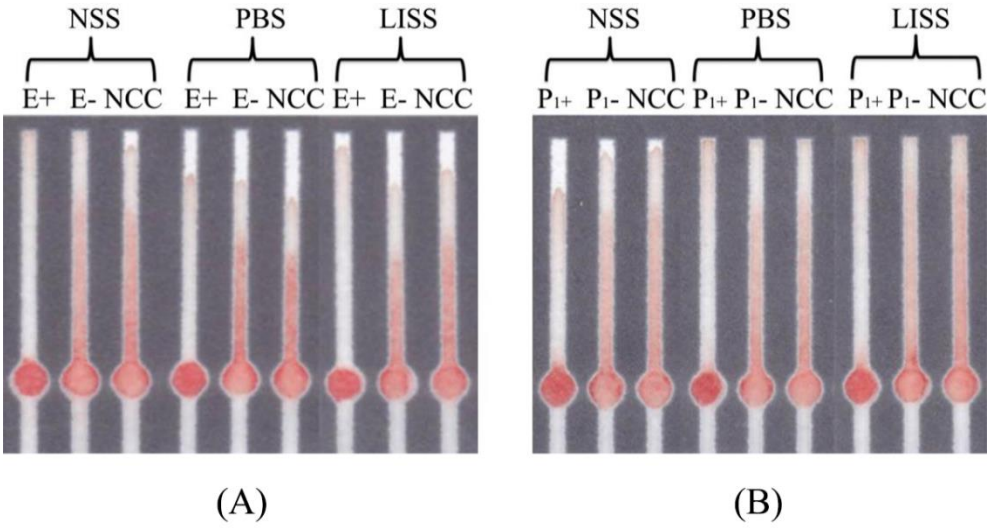
ผลการศึกษาวิจัย

4.1 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

4.1.1 ผลการทดสอบหาสารละลายที่เหมาะสมในการชะปฏิกิริยา

ผลการศึกษาสารละลายที่เหมาะสมในการชะปฏิกิริยา พบว่า การใช้สารละลาย 0.9%NSS (w/v) สามารถชะปฏิกิริยาได้อย่างถูกต้อง โดยผลบวก เม็ดเลือดแดงแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนผลลบเม็ดเลือดแดงไม่จับกลุ่มและถูกชะออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกล มีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและท่อส่วนบน ในขณะที่เม็ดเลือดแดงที่ให้ผลลบ ในบริเวณทดสอบมีสีแดงที่เข้มกว่าการใช้สารละลาย PBS และถูกชะให้ไหลเข้าไปในท่อส่วนบนได้น้อยกว่าและมีความเรียบเนียนของเม็ดเลือดแดงน้อยกว่า โดยเม็ดเลือดแดงจะมีลักษณะกระจายเป็นเม็ดเล็กๆ ทั้งในบริเวณทดสอบและในท่อ ส่วนการใช้สารละลาย PBS pH 7.4 ในการชะปฏิกิริยา พบว่า ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวกและเป็นลบถูกต้องเช่นเดียวกัน โดยผลบวกเม็ดเลือดแดงจะแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบ มีสีแดงเข้มและเรียบเนียนมากกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS และท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนผลลบ เม็ดเลือดแดงที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจะถูกชะให้ไหลเข้าไปในบริเวณท่อส่วนบนได้ไกลที่สุด มีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและท่อส่วนบน และการใช้สารละลาย modified LISS พบว่า ให้ผลการทดสอบที่เป็นบวกและเป็นลบถูกต้อง โดยผลบวกเม็ดเลือดแดงจะแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบโดยมีสีแดงเข้มที่สุด เม็ดเลือดแดงเข้ามาอยู่ใกล้กันมากกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS และ PBS ส่วนผลลบเม็ดเลือดแดงถูกชะเข้าไปในท่อส่วนบนได้

ไม่ไกลและในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มกว่าการใช้สารละลายชนิดอื่นๆ ทำให้อ่านผลของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ยาก ดังแสดงในรูปที่ 22 ดังนั้น สารละลายที่มีความเหมาะสมในการชะปฏิกิริยามากที่สุด คือ สารละลาย PBS และเวลาที่ PBS ไหลจากปลายท่อด้านล่างผ่านบริเวณทดสอบไปจนถึงปลายท่อด้านบนเพื่อชะปฏิกิริยาใช้เวลานาน 3.5 นาที



*NCC คือ Negative control cells ทำปฏิกิริยากับ 6% BSA

รูปที่ 22 แสดงผลของสารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย PBS pH 7.4 และสารละลาย modified LISS ที่ใช้ในการชะปฏิกิริยาสำหรับชุดทดสอบ RBC-Ag typing profile PADs (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti- P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1

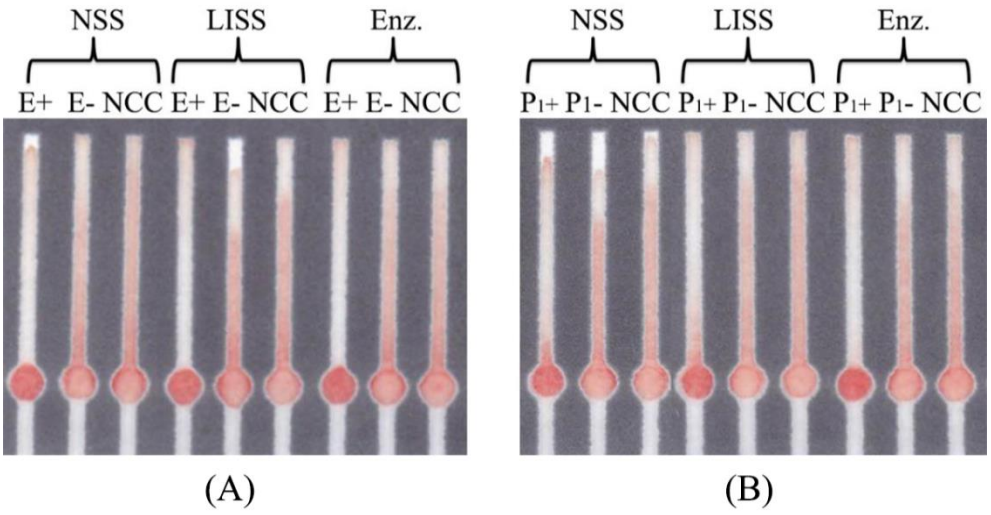
4.1.2 ผลการทดสอบหาชนิดของสารเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด

ผลการศึกษาชนิดของสารเจือจางที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด พบว่า การใช้สารละลาย 0.9%NSS ผลบวก เซลล์ที่มีแอนติเจน D, K, C, E และ c จะจับกับแอนติบอดีทีตรึงไว้บนกระดาษได้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความแรง เม็ดเลือดแดงแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบได้หมด มีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนเซลล์ที่มีแอนติเจน e, Jk^a, Jk^b และ P_1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมี

ความแรงน้อยกว่า แอนติบอดีที่ตรึงไว้จับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงได้ไม่แรง เมื่อชะปฏิกิริยาเม็ดเลือดแดงบางส่วนจึงไหลและหลุดออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อส่วนบน ส่วนผลลบ เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนจะไม่เกิดการจับกลุ่มในบริเวณทดสอบ และถูกชะเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกล มีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและในท่อ การใช้สารละลาย modified LISS ผลบวก เซลล์ที่มีแอนติเจน D, K, C, E และ c สามารถจับกับแอนติบอดีทีตรึงไว้บนกระดาษได้หมด เม็ดเลือดแดงแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบ มีความเรียบเนียนและอยู่ใกล้กันมากขึ้น มีสีแดงเข้มขึ้น มีความชัดเจนของปฏิกิริยามากกกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS และท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนเซลล์ที่มีแอนติเจน e, Jk^a, Jk^b และ P_1 แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงและจับกลุ่มอยู่ในบริเวณทดสอบได้ดีมากขึ้น โดยเม็ดเลือดแดงที่จับกับแอนติบอดีได้ไม่แน่นถูกชะให้หลุดออกไปในท่อน้อยลงเมื่อเทียบกับการใช้สารละลาย 0.9%NSS ส่วนผลลบ เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน จะไม่เกิดการจับกลุ่มในบริเวณทดสอบและถูกชะเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกล มีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและในท่อ และมีความเรียบเนียนของเม็ดเลือดแดงในปฏิกิริยามากกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS

ส่วนการใช้ modified enzyme bromelin พบว่า ผลบวก เซลล์ที่มีแอนติเจน D, K, C, E และ c จะจับกับแอนติบอดีทีตรึงไว้บนกระดาษได้หมด ติดอยู่ในบริเวณทดสอบแผ่กระจายและมีสีแดงเข้มขึ้นกว่าการใช้สารเจือจางทั้งสองชนิด และในท่อส่วนบนขาวสะอาด สำหรับเซลล์ที่มีแอนติเจน e, Jk^a, Jk^b และ P_1 แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในกลุ่มนี้ได้ดีมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในเซลล์บวกที่เป็นชนิด homozygous และชนิด heterozygous ตัวอย่างเช่น anti-P_1 เมื่อ treated cell ของเม็ดเลือดแดงตัวอย่างด้วยเอนไซม์ bromelin ก่อนทำการทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ความแรงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบจะมากขึ้น แอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษจะสามารถจับกับแอนติเจนในตัวอย่างเลือด เกิดการจับกลุ่มอยู่ในบริเวณทดสอบได้หมดและท่อส่วนบนขาวสะอาดเช่นเดียวกับแอนติเจนในกลุ่ม D, K, C, E และ c เป็นต้น ส่วนผลลบ เซลล์

ที่ไม่มีแอนติเจนจะไม่เกิดการจับกลุ่มในบริเวณทดสอบ และถูกชะเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกล มีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและท่อส่วนบนเช่นเดียวกับสารละลายทั้งสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 23 (A) และ (B) ดังนั้น สารละลายที่มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเลือดในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ สารละลาย modified LISS เนื่องจากให้ผลที่ชัดเจน ผลบวกและผลลบที่เกิดขึ้นในการทดสอบมีความแตกต่างกันชัดเจนมากกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS มีความสะดวกรวดเร็วมากกว่าการใช้เอนไซม์ ซึ่งจะต้องมีการ incubate ตัวอย่างเลือดกับเอนไซม์ก่อนการทำการทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงนาน 10 นาที จึงไม่สะดวกต่อการนำมาใช้ในการทดสอบ

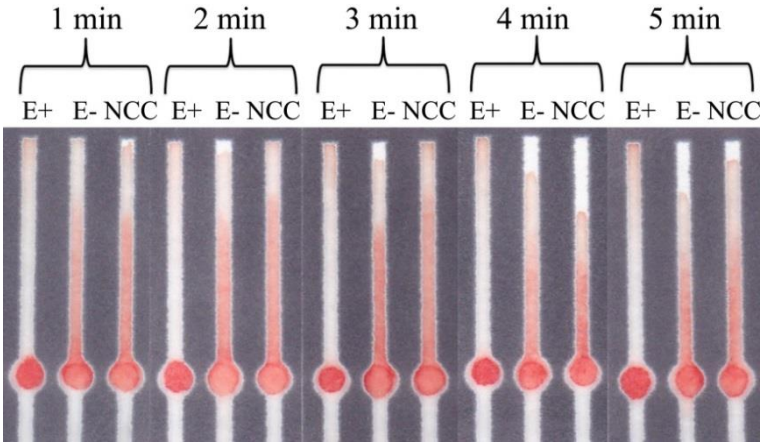


รูปที่ 23 แสดงผลของสารเจือจางชนิดต่างๆ ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย modified LISS และสารละลาย modified enzyme bromelin ที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างเลือด (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti- P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1

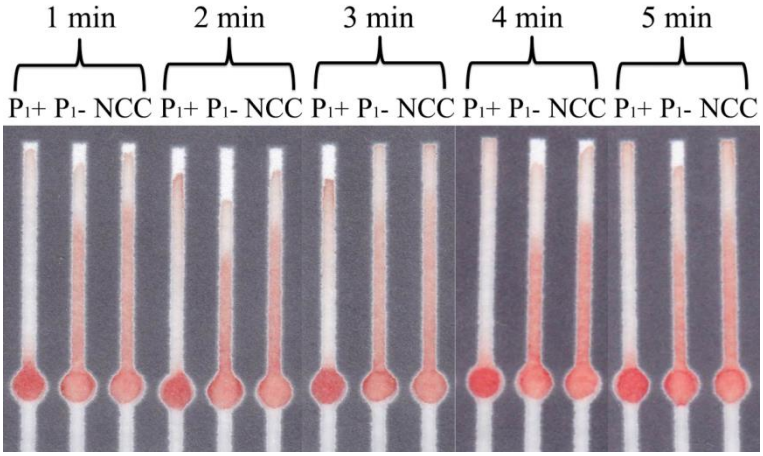
4.1.3 ผลการทดสอบหาเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเหมาะสม

ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง พบว่า การทำปฏิกิริยานาน 1 นาที แอนติบอดีบางชนิดจะยังเกิดปฏิกิริยาได้ไม่เต็มที่ ได้แก่ anti-e, anti-Jk^a, anti-Jk^b และ anti-P_1 เมื่อนำชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ไปชะปฏิกิริยา เม็ดเลือดแดงบางส่วนจะถูกชะให้ไหลและหลุดออกจากบริเวณทดสอบให้เข้ามาในท่อส่วนบน ซึ่งอาจทำให้การอ่านผลของปฏิกิริยาผิดพลาดเป็นลบปลอมได้ เมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 2 นาที พบว่าสามารถอ่านผลบวกและผลลบของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างถูกต้องชัดเจน โดยผลบวก เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนผลลบเม็ดเลือดแดงไม่จับกลุ่มและถูกชะออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกลมีสีแดงจาง เมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 3, 4 และ 5 นาที พบว่า ในบริเวณทดสอบจะมีสีแดงเข้มขึ้น และเม็ดเลือดแดงจะติดอยู่ในบริเวณทดสอบแน่นขึ้น เมื่อชะปฏิกิริยา เม็ดเลือดแดงจะไหลและหลุดออกจากบริเวณทดสอบได้ยากขึ้นและเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อส่วนบนได้น้อยลง จึงอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมในการทดสอบได้ ดังนั้น เวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน คือเวลา 2 นาที ดังแสดงในรูปที่ 24 และ 25

Chulalongkorn University



รูปที่ 24 แสดงผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti-E กับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มี และไม่มีแอนติเจน E เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที



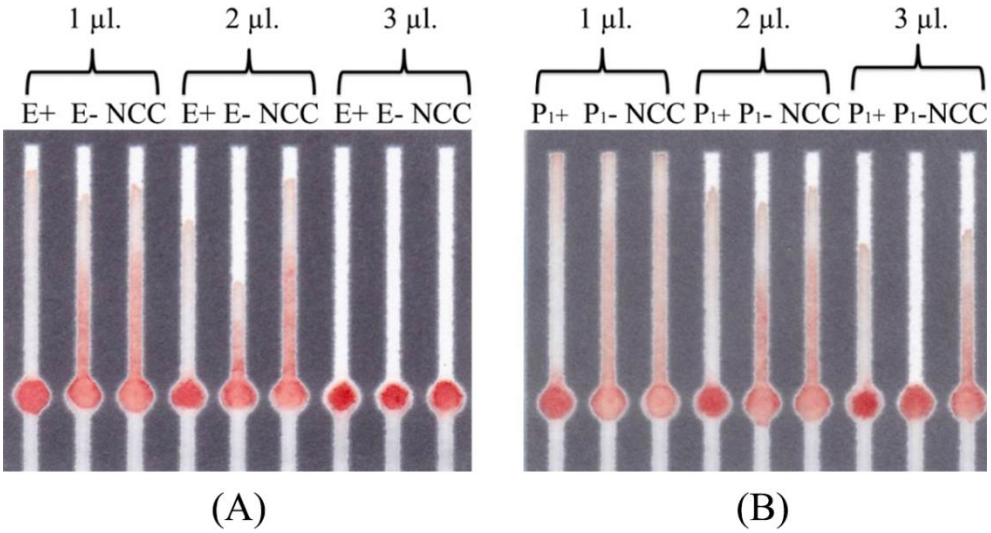
รูปที่ 25 แสดงผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง anti- P_1 กับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มี และไม่มีแอนติเจน P_1 เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

4.1.4 ผลการทดสอบหาปริมาตรของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ผลการศึกษาปริมาตรของแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมในการตรึงบนบริเวณทดสอบของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs พบว่า ปริมาตรของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง คือ 1 ไมโครลิตร เนื่องจากผลการทดสอบระหว่างแอนติบอดีกับเซลล์ที่มี

แอนติเจนและเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนมีความถูกต้องชัดเจน ผลบวก เม็ดเลือดแดงจะเกิดการจับกลุ่มติดอยู่ในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนผลลบเม็ดเลือดแดงไม่จับกลุ่มและถูกชะออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกลมีสีแดงจาง ส่วนการตรึงแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 3 ไมโครลิตรนั้น พบว่า การตรึงแอนติบอดีที่ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มีผลการทดสอบที่เป็นบวกและลบถูกต้อง แต่ผลลบเม็ดเลือดแดงจะเคลื่อนที่เข้าไปในท่อส่วนบนได้ไม่ไกล มีความชัดเจนและความแตกต่างของผลบวกและผลลบในปฏิกิริยาที่น้อยกว่าการใช้แอนติบอดีปริมาตร 1 ไมโครลิตร ส่วนการตรึงแอนติบอดีที่ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกลุ่มจะถูกชะออกไปได้ยาก เนื่องจากการแอนติบอดีที่ตรึงไว้ในบริเวณทดสอบมีปริมาตรมาก จึงขวางการไหลของสารละลาย PBS ดังแสดงใน รูปที่ 26 (A) และ 26 (B) จะสังเกตได้ว่าสารละลาย PBS ไม่สามารถไหลผ่านบริเวณทดสอบเข้าไปชะเม็ดเลือดแดงได้ เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนจึงไม่ถูกชะและจะยังติดอยู่ในบริเวณทดสอบ ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับผลของปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก จึงทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยการใช้แอนติบอดีปริมาตร 3 ไมโครลิตรในการทดสอบได้

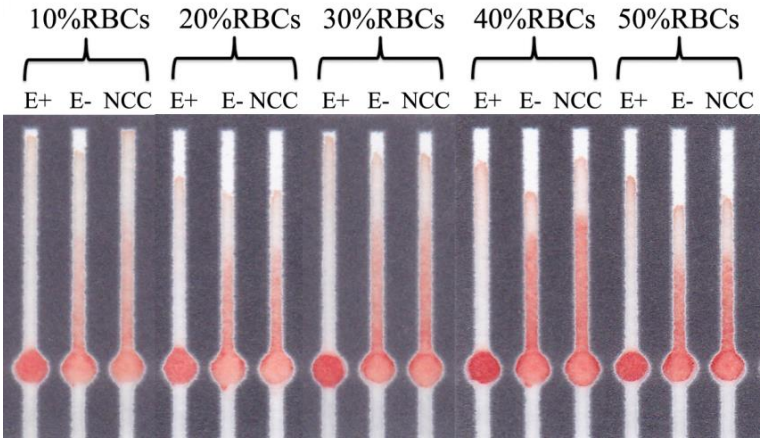
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



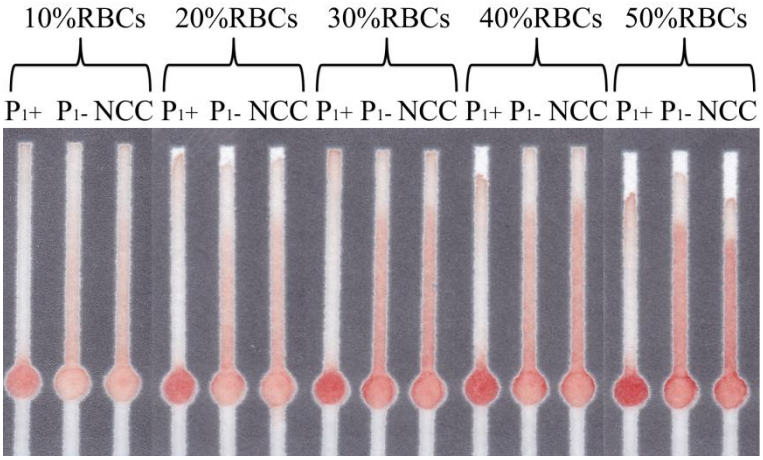
รูปที่ 26 แสดงผลของปริมาตรแอนติบอดีที่ตรึงไว้บนกระดาษ 1, 2 และ 3 ไมโครลิตร (A) anti-E ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มีและไม่มีแอนติเจน E (B) anti- P_1 ทำปฏิกิริยากับเซลล์ตัวอย่างเลือดที่มีและไม่มีแอนติเจน P_1

4.1.5 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด

ผลการศึกษาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงที่มีความเหมาะสมในการทดสอบ พบว่า การเตรียมตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง 30% ในน้ำยา Modified LISS สามารถอ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ชัดเจน เม็ดเลือดแดงที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจะถูกชะออกไปในท่อส่วนบนได้ไกล มีความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบชัดเจนที่สุด ขณะที่ความเข้มข้น 10% และ 20% เม็ดเลือดแดงที่เกิดและไม่เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มในบริเวณทดสอบมีปริมาณน้อย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงมีสีแดงจางเกินไปทั้งในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน ทำให้อ่านของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าได้ยาก และอาจเกิดผลลบปลอมจากการอ่านผลของปฏิกิริยาที่ไม่ถูกต้อง ส่วนตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง 40% และ 50% พบว่า เม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกับแอนติบอดีและไม่จับกลุ่มอยู่ในบริเวณทดสอบ จะถูกชะให้เคลื่อนที่ไหลเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไม่หมด ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมในปฏิกิริยาได้ ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28



รูปที่ 27 แสดงผลของความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างที่ 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลาย modified LISS ทั้งที่มีแอนติเจนและไม่มีแอนติเจน E ทำปฏิกิริยากับ anti-E ที่ตรึงไว้บนในบริเวณทดสอบของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs



รูปที่ 28 แสดงผลของความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างที่ 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลาย modified LISS ทั้งที่มีแอนติเจนและไม่มีแอนติเจน P_1 ทำปฏิกิริยากับ anti-P_1 ที่ตรึงไว้บนในบริเวณทดสอบของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

สรุปสภาวะที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ในงานวิจัยนี้ พบว่า สภาวะที่ให้ผลการทดสอบครอบคลุมสำหรับแอนติเจนทุกชนิดทั้งเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous ชนิด heterozygous และเซลล์ที่ไม่มี

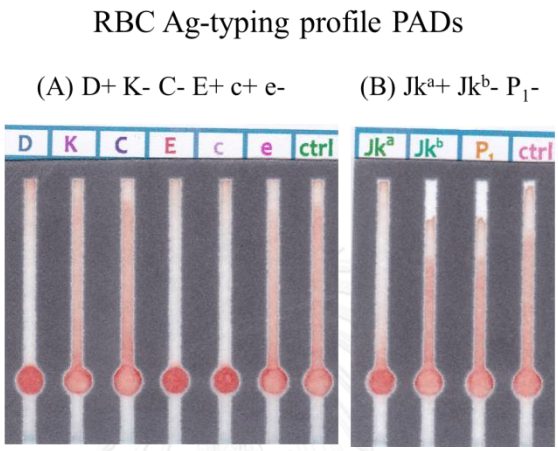
แอนติเจน โดยสามารถอ่านผลบวกและผลลบของปฏิกิริยาได้อย่างถูกต้องชัดเจนที่สุด ไม่ทำให้เกิดผลบวกและผลลบปลอมในปฏิกิริยา ได้แก่ การตรึงแอนติบอดีชนิดต่างๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในบริเวณทดสอบของ RBC Ag-typing profile PADs จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เตรียมตัวอย่างเลือดความเข้มข้น 30%RBCs ในสารละลาย Modified LISS และหยดตัวอย่างเลือดปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ลงในบริเวณทดสอบที่ได้ตรึงแอนติบอดีชนิดต่างๆ แล้ว ทำปฏิกิริยานาน 2 นาที เมื่อครบเวลา ชะปฏิกิริยาด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 เป็นเวลา 3.5 นาที อ่านผลการปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ได้ด้วยตาเปล่า และตรวจยืนยันผลการทดสอบด้วยการวัดค่าความเข้มแสงเฉลี่ยด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J โดยใช้ RGB color mode

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจ RBC Ag-typing profile PADs

4.2.1 การตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ โดยการอ่านผลและแปลผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า

ผลการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ด้วย RBC Ag-typing profile PADs จำนวน 50 ตัวอย่าง เมื่ออ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า คือ ผลบวก เม็ดเลือดแดงแผ่กระจายติดอยู่ในบริเวณทดสอบมีสีแดงเข้มและท่อส่วนบนขาวสะอาด ส่วนผลลบ เม็ดเลือดแดงไม่จับกลุ่มและถูกชะออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อส่วนบนได้ไกลมีสีแดงจางทั้งในบริเวณทดสอบและในท่อ ดังแสดงในรูปที่ 29 ตัวอย่างการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs กับตัวอย่างเลือดที่มีแอนติเจนแต่ละชนิด คือ แอนติเจน D+ K- C- E+ c+ e- Jk^a+ Jk^b- P_1- จะสังเกตได้ว่า (A) PADs 1 และ (B) PADs 2 ในช่องที่ตรึงด้วย anti-D, E, c และ Jk^a เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มแผ่กระจายอยู่ในบริเวณทดสอบอย่างชัดเจน และในบริเวณท่อส่วนบนจะไม่มีเม็ดเลือดแดงที่ถูกชะให้ไหลเข้าไป

ส่วนในช่องที่ตรึงด้วย anti-K, C, e, Jk^b และ P_1 ในบริเวณทดสอบเม็ดเลือดแดงจะไม่เกิดการจับกลุ่ม จึงถูกชะให้หลุดและไหลเข้าไปในท่อส่วนบนเช่นเดียวกับช่อง control cells ซึ่งแสดงถึงผลการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่ถูกต้องทั้งหมด



รูปที่ 29 แสดงการตรวจตัวอย่างเลือดที่มีแอนติเจน D+ K- C- E+ c+ และ e- ใน PADs 1 (A) และแอนติเจน Jk^a+ Jk^b- และ P_1 – ใน PADs 2 (B) ด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

ผลการตรวจแอนติเจนชนิดต่างๆ ที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ทั้งหมดจำนวน 9 ชนิดด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs มีความถูกต้องตรงกันกับผลการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลองทั้งหมด 100% และชนิดของแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่างเลือดแยกตามระบบหมู่เลือด ได้แก่ ระบบ Rh, Kell, Kidd และ P1PK ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงสรุปผลการตรวจชนิดของแอนติเจนในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs แยกตามหมู่เลือดเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง จำนวน 50 ราย ดังนี้

Blood group system	Phenotypes	No. of sample detected by	
		Tube	PADs
Rh	R_1R_1 (D+ C+ E- c- e+)	20	20
	R_1r (D+ C+ E- c+ e+)	5	5
	R_1R_2 (D+ C+ E+ c+ e+)	12	12
	R_2R_2** (D+ C+ E- c- e+)	5	5
	R_2r* (D+ C- E+ c+ e+)	1	1
	rr** (D- C- E- c+ e+)	3	3
	r'r** (D- C+ E- c+ e+)	3	3
	r'r'* (D- C+ E- c- e+)	1	1
Kell	K+**	3	3
	K-	47	47
Kidd	Jk (a+b-)	13	13
	Jk (a+b+)	20	20
	Jk (a-b+)	7	7
P1PK	P_1+	26	26
	P_1-	24	24

*Panel cell lot no.59020 **Panel cell lot no. 58100, 58110 and 58120

4.2.2 การตรวจยืนยันชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (RBC) ในตัวอย่างเลือดและชุดเซลล์ โดยการตรวจวัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J

ผลการตรวจวัดค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพในบริเวณทดสอบกับบริเวณท่อส่วนบน และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพระหว่างสองบริเวณ (C-D) ของแอนติเจนแต่ละชนิด พบว่า เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนจะให้ผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพมากกว่าเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีแอนติเจนอย่างชัดเจน คือ ผลบวกของแอนติเจนในหมู่เลือดระบบ Rh และ Kell ของ RBC Ag-typing profile PADs 1 มีค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพระหว่างสองบริเวณ (C-D) สูง โดยมีค่าต่ำสุด คือ 50.75 ± 7.98 ในแอนติเจน e ที่เป็นเซลล์ชนิด heterozygous และมีค่าสูงสุด คือ 84.00 ± 4.55 ใน แอนติเจน E ที่เป็นเซลล์ชนิด homozygous ส่วนใน PADs 2 จะมีค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพระหว่างสองบริเวณ (C-D) ที่ต่ำกว่าแอนติเจนที่ตรวจด้วย PADs 1 มีค่าต่ำสุด คือ 35.37 ± 4.62 ในแอนติเจน Jk^b ที่เป็นเซลล์ชนิด heterozygous และมีค่าสูงสุด คือ 56.08 ± 4.91 ในแอนติเจน Jk^a ที่เป็นเซลล์ชนิด homozygous ผลลบในเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน พบว่า มีค่าต่ำสุด คือ 5.15 ± 5.24 ในเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน Jk^b และค่าสูงสุด คือ 11.25 ± 4.03 ในเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน e ดังแสดงในตารางที่ 9

เมื่อเปรียบเทียบค่า C-D ของเซลล์ที่มีและไม่มีแอนติเจน นำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้สถิติ compared mean independent sample t-test ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้พบว่า มีค่า $p<0.01$ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ในทุกๆ แอนติเจนทุกชนิดที่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ และเมื่อนำข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพระหว่างสองบริเวณ (C-D) ของแอนติเจนแต่ละชนิดมา plot เป็นกราฟแท่งด้วยโปรแกรม Sigma plot จะได้กราฟแท่งแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพในเซลล์ที่มี

Chulalongkorn University

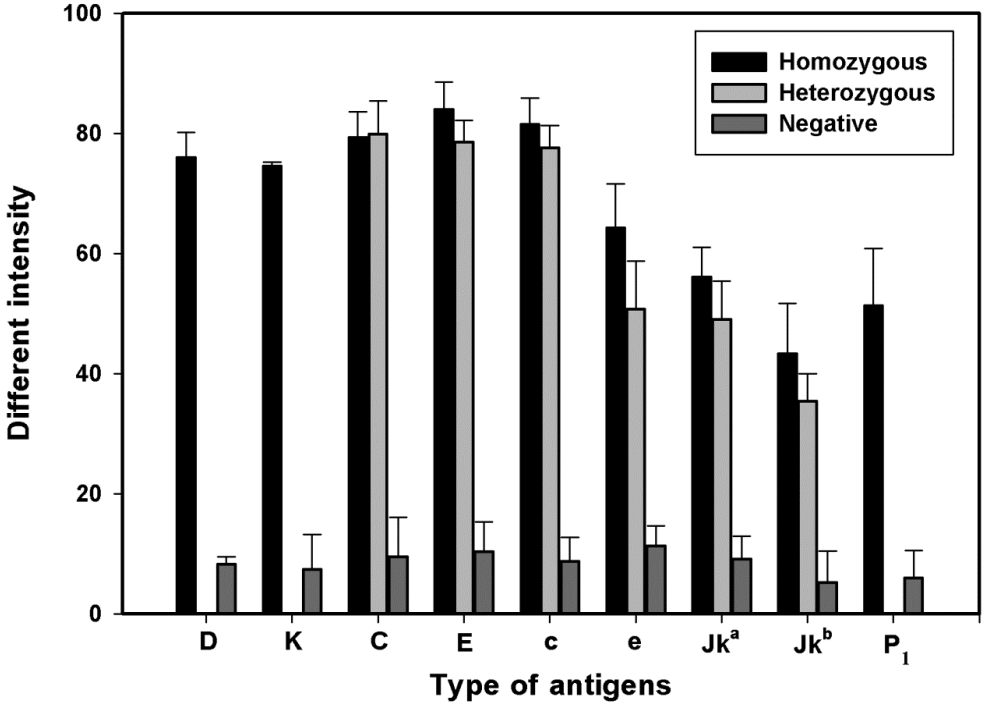
แอนติเจนทั้งชนิด homozygous และ heterozygous เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 30

ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มแสงเฉลี่ยที่วัดได้ในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อ และแสดงผลต่างของความเข้มแสงเฉลี่ยของทั้งสองบริเวณในเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous ชนิด heterozygous และเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน แยกตามชนิดของแอนติเจนที่ทำการทดสอบ

Type of antigens	Pixel intensity					
	Positive			Negative		
	Detection zone (D)	Channel area (C)	C-D$^{(1)}$	Detection zone (D)	Channel area (C)	C-D$^{(2)}$
D	148.68 ± 4.19	224.68 ± 2.91	76.00 ± 4.20$^{\#}$	173.75 ± 3.30	182.00 ± 2.71	8.25 ± 1.26
C	145.90 ± 3.24*	225.19 ± 3.41*	79.29 ± 4.33$^{\#}$	175.50 ± 5.05	185.00 ± 3.85	9.50 ± 5.81
	145.06 ± 5.35**	225.00 ± 2.85**	79.94 ± 5.50$^{\#}$			
E	139.25 ± 3.24*	223.25 ± 3.10*	84.00 ± 4.55$^{\#}$	175.33 ± 4.92	183.29 ± 3.79	10.33 ± 6.53
	143.22 ± 3.49**	221.78 ± 2.44**	78.56 ± 3.56$^{\#}$			
c	141.00 ± 4.47*	222.50 ± 2.33*	81.50 ± 4.44$^{\#}$	175.67 ± 4.26	183.06 ± 3.96	8.67 ± 4.97
	145.55 ± 5.45**	223.27 ± 2.49**	77.57 ± 3.74$^{\#}$			
e	149.83 ± 4.24*	214.13 ± 4.82*	64.29 ± 7.26$^{\#}$	174.00 ± 4.24	185.25 ± 3.10	11.25 ± 4.03
	155.38 ± 6.25**	206.13 ± 4.16**	50.75 ± 7.98$^{\#}$			
K	146.00 ± 0.00	220.00 ± 0.71	74.50 ± 0.71$^{\#}$	176.27 ± 4.96	183.67 ± 5.26	7.39 ± 3.40
Jk^{a}	157.69 ± 3.45*	213.77 ± 3.14*	56.08 ± 4.91$^{\#}$	177.82 ± 4.85	186.94 ± 6.03	9.12 ± 3.77
	160.94 ± 3.37**	209.94 ± 4.39**	49.00 ± 6.41$^{\#}$			
Jk^{b}	159.59 ± 7.83*	202.88 ± 4.73*	43.29 ± 8.38$^{\#}$	179.38 ± 3.48	184.54 ± 4.65	5.15 ± 5.24
	164.16 ± 4.26*	199.53 ± 3.86*	35.37 ± 4.62$^{\#}$			
P_1	157.00 ± 5.52	208.27 ± 6.23	51.27 ± 9.52$^{\#}$	178.50 ± 4.57	184.42 ± 3.59	5.92 ± 4.60

*homozygous genotype **heterozygous genotype

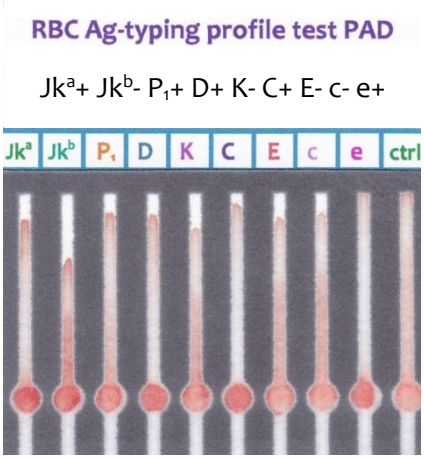
$^{\#}$ ค่า $p<0.01$; เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง C-D$^{(1)}$ and C-D$^{(2)}$ ในแอนติเจนแต่ละชนิด



รูปที่ 30 แสดงกราฟของความแตกต่างของค่าความเข้มแสงเฉลี่ยที่วัดได้ในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) ในเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous และ heterozygous เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน

4.3 ผลการทดสอบความคงตัวของของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs

ผลการทดสอบความคงตัวของของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน พบว่า ผลการทดสอบที่ได้จากการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดจากชุดเซลล์ (panel cells O_1-O_{11}) จำนวน 5 ตัวอย่าง มีความถูกต้องตรงกันกับแอนติเจนในตาราง panel cells ทั้งหมด ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 31



รูปที่ 31 แสดงตัวอย่างผลการตรวจชนิดของแอนติเจนหมู่เลือดต่างๆ ด้วยชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษาวิจัย

จากผลการศึกษาสารละลายที่มีความเหมาะสมในการชะปฏิกิริยาด้วยสารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย PBS pH 7.4 และสารละลาย modified LISS ผลการศึกษา พบว่า สารละลาย PBS pH 7.4 เป็นสารที่มีความเหมาะสมในการปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงมากที่สุด โดยเม็ดเลือดแดงที่จับกลุ่มจะไม่ถูกชะออกจากบริเวณทดสอบส่วนเม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกลุ่มจะถูกชะออกไปในบริเวณของท่อได้ไกล และเม็ดเลือดแดงบนชุดทดสอบมีความเรียบเนียน อ่านผลปฏิกิริยาได้ง่าย เนื่องจากสารละลาย PBS มีคุณสมบัติที่เป็นบัฟเฟอร์ สามารถรักษาระดับ pH ของสารละลายเอาไว้ได้โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH น้อยมาก ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ PBS ที่มี pH 7.4 ซึ่งเป็น pH ที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen และ antibody ส่วนใหญ่ที่อยู่ในช่วง pH 6.5 - 7.5 (21, 29) ในขณะที่สารละลาย 0.9%NSS และสารละลาย modified LISS ไม่มีคุณสมบัติที่เป็นบัฟเฟอร์ ไม่สามารถรักษาระดับ pH ของสารละลายได้ และมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.5 - 6.0 และ 6.7 ± 0.2 ตามลำดับ สภาวะที่เป็นกรดของสารละลาย 0.9%NSS ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงตัวอย่างในปฏิกิริยาที่ทำการทดสอบเกิดการหดตัว (shrinkage) จึงเห็นเม็ดเลือดแดงในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อมีลักษณะกระจายตัวเป็นเม็ดเล็กๆ ไม่เรียบเนียน ส่วนการชะปฏิกิริยาด้วยสารละลาย modified LISS เม็ดเลือดแดงที่จับกลุ่มและไม่จับกลุ่มในปฏิกิริยาจะมีสีแดงเข้มกว่าการใช้สารละลายชนิดอื่นๆ เนื่องจากสารละลาย modified LISS มีคุณสมบัติที่เป็น low ionic strength ช่วยลด zeta potential ระหว่างเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงเข้ามาอยู่ใกล้กันได้มากขึ้น ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ไม่เกิดการจับกลุ่มถูกชะออกจากบริเวณทดสอบได้ยากและเคลื่อนที่เข้า

Chulalongkorn University

ไปในท่อได้ไม่ไกล จึงทำให้แยกความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบในการทดสอบได้ยากกว่าสารละลาย PBS และสารละลาย 0.9%NSS จึงไม่เหมาะในการนำมาใช้ในการชะปฏิกิริยา

การศึกษาสารเจือจางที่มีความเหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างเลือด โดยใช้สารเจือจางที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ สารละลาย 0.9%NSS สารละลาย modified LISS และสารละลาย enzyme bromelin จากผลการศึกษา พบว่า สารละลาย modified LISS เป็นสารเจือจางทีมีความเหมาะสมที่สุดในการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจชนิดของแอนติเจนในชุดทดสอบ PADs 1 ซึ่งได้แก่ แอนติเจน D, K, C, E, c และ e เนื่องจากสารละลาย modified LISS มีคุณสมบัติในการลด zeta potential ในปฏิกิริยา ทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มอยู่ในบริเวณทดสอบได้ดีมากกว่าการใช้สารละลาย 0.9%NSS ส่วนการใช้สารละลายละลาย enzyme bromelin ในการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับชุดทดสอบ PADs 1 พบว่า ผลการทดสอบที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลาย modified LISS ในการเตรียมตัวอย่าง การเลือกใช้ enzyme bromelin ในการศึกษาสำหรับงานวิจัยนี้ เนื่องจากการใช้ enzyme bromelin ในการ treated cell เพื่อย่อยเม็ดเลือดแดงมีความจำเพาะมากกว่าและมีผลบวกปลอมในการทดสอบน้อยกว่าการใช้ enzyme papain (19, 34) และการใช้ enzyme bromelin ในการเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจชนิดของแอนติเจนในชุดทดสอบ PADs 2 ซึ่งได้แก่ แอนติเจน P_1, Jk^a และ Jk^b พบว่า เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนจะสามารถจับกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้และเกิดการจับกลุ่มติดอยู่ในบริเวณทดสอบได้ดีขึ้น ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs แยกออกเป็น 2 ชุด เพื่อความสะดวกในการเลือกใช้งาน คือ ชุดทดสอบ PADs 1 สำหรับการตรวจแอนติเจน D, K, C, E, c และ e เนื่องจากน้ำยาแอนติซีรัมที่ใช้ในการตรวจมีความแรงสูงจึงเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้อย่างชัดเจน สามารอ่านผลของปฏิกิริยาได้ง่าย อีกทั้งแอนติบอดีต่อแอนติเจนในหมู่เลือดระบบ Rh เป็นแอนติบอดีที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดทั้งในแบบทั่วไปและในผู้ป่วยโรคเลือดที่ต้องได้รับเลือดเป็นประจำทั้งใน

ประเทศไทยและต่างประเทศ (4-6, 8, 56, 57) ซึ่งมีความต้องการในการใช้งานสำหรับการตรวจชนิดของแอนติเจนต่างๆ เหล่านี้มากกว่าใน PADs 2 และชุดทดสอบ PADs 2 สำหรับตรวจแอนติเจน Jk^a, Jk^b, และ P_1 น้ำยาแอนติซีรัมที่ใช้ในการตรวจแอนติเจนกลุ่มนี้มีความแรงต่ำจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่อ่อนกว่าการตรวจในชุดทดสอบ PADs 1 แต่การใช้เอนไซม์ bromelin ในการ treated เซลล์ตัวอย่างก่อนทำการทดสอบจะทำให้เห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ชัดเจนมากขึ้น ทั้งยังมีการตรวจพบแอนติบอดีเหล่านี้ในผู้ป่วยได้น้อยกว่า จึงมีความต้องการในการใช้งานที่น้อยกว่า PADs 1 แต่เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างเลือดต้องมีการ incubate ตัวอย่างเลือดกับสารละลาย enzyme bromelin ก่อนทำการทดสอบนาน 10 นาที รวมทั้งมีราคาที่แพงกว่าการใช้สารละลาย modified LISS การตรวจแอนติเจนทั้ง 9 ชนิด พร้อมกันในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลาย modified LISS ในการเตรียมตัวอย่างเลือด ซึ่งให้ผลการตรวจที่ชัดเจนในแอนติเจน D, K, C, E, c และ e และให้ผลการตรวจที่อ่อนกว่าการใช้สารละลาย enzyme bromelin ในแอนติเจน Jk^a, Jk^b, และ P_1 แต่หากสามารถจัดหาแอนติบอดีที่มีความแรงมากกว่านี้มาใช้ในการตรวจได้ก็จะช่วยให้ผลการทดสอบมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้นได้

การศึกษาเวลาในการทำปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสม พบว่า เวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนและแอนติบอดีแต่ละคู่มีความแตกต่างกัน และจากการที่งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงที่สามารถตรวจแอนติเจนได้หลายชนิดพร้อมกัน ในการศึกษาจึงได้ออกแบบให้มีการทำปฏิกิริยาในเวลาที่เท่ากันโดยเริ่มต้นศึกษาที่เวลา 1 นาที พบว่า แอนติเจน D, K, C, E และ c สามารถอ่านผลของปฏิกิริยาได้อย่างถูกต้อง ชัดเจน แต่แอนติเจน e, P_1, Jk^a และ Jk^b แอนติบอดีจะยังจับกับแอนติเจนได้ไม่หมด เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนและให้ผลบวกบางส่วนถูกชะออกไปในท่อ ปฏิกิริยาจับกลุ่มที่เกิดขึ้นในชุดทดสอบจึงไม่ชัดเจน เมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 2, 3 ,4 และ 5 นาที พบว่าเวลาในการทำ

ปฏิกิริยาที่ 2 นาทีมีความเหมาะสมมากที่สุด แอนติเจนที่ทำการทดสอบทุกชนิดให้ผลบวกและผลลบถูกต้อง โดยไม่เกิดผลบวกและผลลบปลอม ส่วนการทำปฏิกิริยาที่เวลา 3-5 นาที เม็ดเลือดแดงติดอยู่ในบริเวณทดสอบนาน จึงถูกชะออกจากบริเวณทดสอบได้ยากขึ้น โดยเฉพาะการทำปฏิกิริยาที่เวลา 5 นาที เม็ดเลือดแดงจะติดอยู่ในบริเวณทดสอบมากขึ้น บริเวณทดสอบจึงมีสีแดงเข้มมากขึ้น และเมื่อชะปฏิกิริยาด้วยสารละลาย PBS เม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกลุ่มจะถูกชะออกไปได้น้อยที่สุด มีความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบในปฏิกิริยาน้อยที่สุดและอ่านผลการทดสอบของปฏิกิริยาได้ยาก

การศึกษาปริมาตรของแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา จากการศึกษา พบว่าปริมาตรแอนติบอดีที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 1 ไมโครลิตร เนื่องจากโปรตีน albumin ในแอนติบอดีมีผลทำให้แอนติบอดีถูกตรึงอยู่ในบริเวณทดสอบได้แน่นจึงส่งผลต่อการไหลของสารละลาย PBS ผ่านบริเวณทดสอบเพื่อชะปฏิกิริยา โดยปริมาณของโปรตีน albumin ที่มีในแอนติบอดีแต่ละชนิดซึ่งวัดค่าของโปรตีนด้วยเครื่อง automate Becman AU680 ในหน่วย g/dl พบว่า มีค่าดังนี้ ใน anti-D มีค่าโปรตีน albumin 1.65, anti-K มีค่า 4.92, anti-C มีค่า 4.73, anti-E มีค่า 5.17, anti-c มีค่า 4.98, anti-e มีค่า 4.86, anti-P_1 มีค่า 3.26, anti-Jk^a มีค่า 5.23 และ anti-Jk^b มีค่า 5.25 mg/dl เมื่อเพิ่มปริมาตรของแอนติบอดีในบริเวณทดสอบเป็น 2 ไมโครลิตร สารละลาย PBS จะไหลผ่านบริเวณทดสอบได้ยากขึ้น เม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกลุ่มจะถูกชะออกจากบริเวณทดสอบเข้าไปในท่อได้น้อยลง และเมื่อเพิ่มปริมาตรแอนติบอดีเป็น 3 ไมโครลิตร โปรตีนในแอนติบอดีที่ถูกตรึงในบริเวณทดสอบมีมากขึ้นและแน่นขึ้น จึงขวางการไหลของสารละลาย PBS ทำให้ไม่สามารถไหลผ่านไปชะเม็ดเลือดแดงในบริเวณทดสอบได้และเกิดเป็นผลบวกปลอมในการทดสอบของแอนติบอดีทุกชนิด ยกเว้น anti-D เนื่องจากปริมาณของโปรตีน albumin ในแอนติบอดีมีน้อยเพียง 1.65 mg/dl จึงไม่ส่งผลต่อการไหลของสารละลาย PBS ในการชะปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของโปรตีนที่แตกต่างกันยังส่งผลให้การการชะปฏิกิริยาด้วยสารละลาย PBS มีความแตกต่างกันอีกด้วย เช่น

Chulalongkorn University

สารละลาย PBS จะไหลผ่านบริเวณทดสอบและชะปฏิกิริยาในการทดสอบที่ตรึงด้วย anti-P_1 ซึ่งมีปริมาณของโปรตีน 3.26 mg/dl ได้ดีกว่าการตรึงด้วย anti-E ซึ่งมีปริมาณของโปรตีน 5.17 mg/dl เป็นต้น

การศึกษาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างเลือด จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (59) ที่มีการตรวจหมู่เลือดในระบบ ABO และ Rh (D) โดยใช้หลักการการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและวัดอัตราส่วนระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดงต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของซีรัม ซึ่งได้เตรียมตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้น 20%RBCs ในสารละลาย LISS งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยเพิ่มและลดความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 10%, 20%, 30%, 40% และ 50%RBCs ในสารละลาย modified LISS พบว่า ผลการศึกษาความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงในการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ คือ 30%RBCs ในสารละลาย modified LISS เนื่องจากเม็ดเลือดแดงที่ไม่จับกลุ่มถูกชะออกไปในท่อได้ไกล มีความแตกต่างระหว่างผลบวกและผลลบมากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้าที่ทำการทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างเลือด 20%RBCs ในสารละลาย LISS เนื่องจากการทดสอบปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในการศึกษานี้และงานวิจัยก่อนหน้าใช้หลักการการอ่านผลที่แตกต่างกัน

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง โดยในเบื้องต้นได้ทำการศึกษาแอนติเจนหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีและในตัวอย่างเลือดบางส่วนที่หายากจากชุดเซลล์ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมทั้งสิ้นจำนวน 50 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA จำนวน 37 ตัวอย่าง และชุดเซลล์ (Panel cells O_1-O_{11}) จำนวน 13 ตัวอย่าง เพื่อให้มีแอนติเจนหมู่เลือดที่หลากหลายและครอบคลุมแอนติเจนทุกชนิดทั้งเซลล์ที่มีแอนติเจนชนิด homozygous ชนิดheterozygous และเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน เนื่องจากเซลล์บางชนิดหาได้ยาก เช่น เซลล์ที่มีจีโนไทป์เป็น rr (D- C- E- c+

e+) หรือ r'r' (D- C+ E- c- e+) ซึ่งพบได้น้อยกว่า 0.3% ในประชากรไทย และเซลล์ที่มีจีโนไทป์เป็น R_1R_2 (D+ C+ E+ c+ e+) หรือ R_2r (D+ C- E+ c+ e+) เป็นเซลล์ชนิด heterozygous E cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบได้น้อยและมีความแรงของแอนติเจนน้อยกว่าเซลล์ชนิด homozygous E cells เป็นต้น การศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง สามารถคำนวณความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ได้จากสูตร sensitivity = [TP/(TP+FP)] และ specificity = [TN/(TN+FP)] ในงานวิจัยนี้มีความไวและความจำเพาะในการตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือด 100% ผลการทดสอบที่ได้จึงมีความน่าเชื่อถือและสามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามควรประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่ได้พัฒนาขึ้นเพิ่มเติมให้ครอบคลุมกับแอนติเจนในตัวอย่างเลือดของประชากรทุกกลุ่ม เช่น ตัวอย่างเลือดจากเด็ก ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย หรือ sickle cell anemia เป็นต้น และทำการทดสอบในตัวอย่างเลือดที่จำนวนมากขึ้น เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในการนำไปใช้งานจริงในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การตรวจยืนยันผลการทดสอบของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่อ่านผลด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image J ใน RGB mode พบว่า ควรทำการศึกษาการตรวจแอนติเจนแต่ละชนิดให้มากขึ้น เช่น N=100 เพื่อลดความแปรปรวนของผลต่างความเข้มแสง และสามารถวิเคราะห์ค่า C-D ± SD ที่ได้จากการทดสอบนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการอ่านผลและแปลผลการทดสอบได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการพัฒนาเป็นเครื่องมืออัตโนมัติในอนาคตสำหรับช่วยอ่านผลและแปลผลการทดสอบตัวอย่างเลือด

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าความแรงของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลองและชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ให้ผลเป็นไปในทิศทาง

เดียวกันและสอดคล้องกับความแตกต่างเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพที่ใช้ในการตรวจยืนยัน คือ RBC Ag-typing profile PADs 1 ที่ตรึงด้วย anti-D (titer 1:128) anti-C, anti-E, anti-c, anti-e และ anti- K (titer 1:32) ความแรงของน้ำยาแอนติซีรัมที่ใช้ในการตรึงบนทดสอบและความเป็น immunogenicity ของแอนติเจนชนิดต่างๆ มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเมื่อตรวจชนิดของแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ผลบวก เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มและมีความแรงของปฏิกิริยา 3^{+}-4^{+} ส่วนวิธี PADs เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มอยู่ในกลุ่มบริเวณทดสอบได้หมด ท่อส่วนบนขาวสะอาด สามารถอ่านผลบวกของปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจน ยกเว้นแอนติเจน e การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะมีความแรงของปฏิกิริยาที่อ่อนกว่าแอนติเจนอื่นๆ ในระบบ Rh ทั้งในวิธีมาตรฐานหลอดทดลองและวิธี PADs เนื่องจากแอนติเจน e มีความเป็น immunogenicity น้อยที่สุดในระบบ Rh (D > c > E > C > e) (24) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มแสงของภาพในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) สำหรับแอนติเจน D, C, E และ c มีค่าสูงสุด คือ 84.00 $\pm$ 4.55 (แอนติเจน E ที่เป็นเซลล์ชนิด homozygous) และมีค่าต่ำสุด คือ 77.57 ± 3.74 (แอนติเจน c ที่เป็นเซลล์ชนิด heterozygous) สำหรับแอนติเจน e มีค่า C-D สูงสุด คือ 64.29 ± 7.26 (เซลล์ชนิด homozygous) และมีค่าต่ำสุด คือ 50.75 ± 7.98 (เซลล์ชนิด heterozygous) ส่วนเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน D, C, E, c และ e ที่ให้ผลลบในการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง และในวิธี PADs พบว่า เม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดไม่เกิดการจับกลุ่ม มีค่าความแตกต่างเฉลี่ยของความเข้มแสงของภาพในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) สูงสุด คือ 11.25 ± 4.03 (เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน D) และต่ำสุด คือ 8.25 ± 1.26 (เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน e) โดยผลการทดสอบทั้งหมดมีความสอดคล้องกับการอ่านผลของปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า ส่วนใน RBC Ag-typing profile PADs 2 ที่ตรึงด้วย anti-Jk^{a}, anti-Jk^{b} (titer 1:4) และ anti-P_1 (titer 1:8) น้ำยาแอนติซีรัมมีความแรงต่ำ เซลล์ที่มีแอนติเจนจะให้ผลบวกในปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงในการทดสอบด้วย anti-

Jk^a และ anti-Jk^b ที่มีความแรง w^+-2^+ ในวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง และมีความแรงของปฏิกิริยา 1^+-3^+ ในการทดสอบด้วย anti-P_1 ส่วนวิธี PADs เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนจับกับแอนติบอดีและจับกลุ่มอยู่ในบริเวณทดสอบได้ไม่แน่น เซลล์ในตัวอย่างเลือดบางส่วนจึงถูกชะให้หลุดและไหลเข้าไปในท่อในท่อส่วนบน จึงเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่มีสีแดงจางกว่ากลุ่มของปฏิกิริยาระหว่าง antigen-antibody ในชุดทดสอบ PADs 1 เนื่องจากแอนติเจนในกลุ่มที่ทำการทดสอบใน PADs 2 จะมีความสามารถในการจับกันแอนติบอดีแบบ low affinity และมีค่าความแตกต่างเฉลี่ยของความเข้มแสงของภาพในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) สูงสุด คือ 56.08 ± 4.91 (แอนติเจน Jk^a เซลล์ที่เป็นชนิด homozygous) และต่ำสุด คือ 35.37 ± 4.62 (แอนติเจน Jk^b เซลล์ที่เป็นชนิด heterozygous) สำหรับเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน หรือให้ผลลบ มีค่าความแตกต่างเฉลี่ยของความเข้มแสงของภาพในบริเวณทดสอบและบริเวณท่อส่วนบน (C-D) สูงสุด คือ 9.12 ± 3.77 (เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน Jk^a) และต่ำสุด คือ 5.15 ± 5.24 (เซลล์ที่ไม่มีแอนติเจน Jk^b)

การตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างเลือดด้วยวิธี PADs ต้องมีการล้างเซลล์และมีการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลองและวิธีคอลัมน์ เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและชัดเจนมากที่สุด ในการตรวจแอนติเจนในตัวอย่างเลือดที่มี hemolysis เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย หรือการที่ตัวอย่างเลือดมีซีรัมขุ่น (lipemic) พบว่า ปัจจัยเหล่านี้ ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบ แต่การนำตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ซึ่งเก็บไว้นานเกิน 7 วัน มาทำการทดสอบ พบว่า แอนติเจนบางชนิดจะอ่อนลงได้ (detolerate) ทำให้ผลของปฏิกิริยาในการทดสอบมีความคลาดเคลื่อน หรือการนำตัวอย่างเลือดที่เกิด hemolysis ในปริมาณมากๆ มาทำการทดสอบ อาจทำให้ได้ผลการตรวจที่ไม่ถูกต้อง จึงควรระมัดระวังในการอ่านผลและแปลผลการทดสอบโดยการใช้ตัวอย่างเลือดดังกล่าว

Chulalongkorn University

การศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่พัฒนาขึ้น โดยเตรียมชุดทดสอบในครั้งเดียวกัน และเก็บชุดทดสอบที่ได้เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 1-6 °C เป็นเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 1, 2 สัปดาห์ และ 1 เดือน พบว่า สามารถเก็บชุดทดสอบที่เตรียมไว้ได้ที่อุณหภูมิ 1-6 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน โดยผลการทดสอบที่ได้มีความถูกต้อง สามารถอ่านผลบวกและผลลบในปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจน สำหรับการนำชุดทดสอบที่ได้ไปใช้จริงในอนาคตหรือพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป ควรทำการศึกษาความคงตัวของชุดทดสอบเพิ่มเติมที่ระยะเวลา 6 เดือน หรือ 1 ปี โดยทดสอบกับตัวอย่างเลือดเดิมซ้ำโดยการนำตัวอย่างเลือดที่เหลือจากการทดสอบแบ่งและ freeze เก็บไว้ สำหรับทดสอบในระยะเวลาต่างๆ แต่ละครั้ง หรือเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิตรายเดิมที่มาบริจาคโลหิตซ้ำ เป็นต้น และควรตรวจวัดค่าความเข้มแสงเฉลี่ยของภาพที่ได้จากการทดสอบในแต่ละระยะเวลาเพื่อนำมาคำนวณค่า C-D เปรียบเทียบกันเพื่อควบคุมคุณภาพของชุดทดสอบ ซึ่งค่า C-D ที่ได้จากการทดสอบในแต่ละครั้งควรมีค่าที่ใกล้เคียงกัน

RBC Ag-typing profile PADs ที่ได้พัฒนาขึ้น เป็นชุดทดสอบที่มีราคาถูกและต้นทุนต่ำ เนื่องจากวัสดุที่ใช้ในการทดสอบทำมาจากกระดาษและใช้แอนติบอดีในการตรวจเพียงปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีมาตรฐานหลอดทดลองถึง 50 เท่า เมื่อคำนวณต้นทุนในส่วนของน้ำยาและวัสดุที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลองและวิธีคอลัมน์ พบว่า ราคาต่อการทดสอบเปรียบเทียบใน PADs 1 ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์แอนติเจนในหมู่เลือดระบบ Rh (D, C, E, c และ e) และ Kell (K) วิธี PADs มีราคาต้นทุนเท่ากับ 8.075 บาท ส่วนการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง มีราคาต่อการทดสอบโดยประมาณเท่ากับ 117.16 บาท และการทดสอบด้วยวิธีคอลัมน์ มีราคาต่อการทดสอบโดยประมาณเท่ากับ 447.39 บาท สำหรับ PADs 2 มีราคาต้นทุนเท่ากับ 7.078 บาท วิธีมาตรฐานหลอดทดลอง มีราคาต่อการทดสอบโดยประมาณเท่ากับ 189.87 บาท และวิธีคอลัมน์ มีราคาต่อการทดสอบโดยประมาณเท่ากับ 321.05 บาท ทั้งนี้วิธี PADs ยังใช้

ปริมาตรตัวอย่างเลือดในการทดสอบที่น้อยกว่า และไม่ต้องอาศัยเครื่องมืออื่นๆ เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง การตกตะกอน หรือหลอดทดลองพลาสติกที่สิ้นเปลืองจากการใช้แล้วทิ้ง และไม่มีการเขย่าเพื่ออ่านผลปฏิกิริยา จึงทำให้ไม่เกิด variation ในการอ่านผลของปฏิกิริยาในการทดสอบ

นอกจากนี้ชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ยังมีขนาดเล็ก น้ำหนักเบา สะดวกต่อเคลื่อนย้ายหรือจัดเก็บ มีการใช้งานที่ง่าย อาศัยการเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและอ่านผลการทดสอบที่ได้ด้วยตาเปล่า สามารถตรวจแอนติเจนหมู่เลือดในตัวอย่างได้พร้อมกันในปริมาณมาก ทราบผลได้รวดเร็วภายในเวลา 10 นาที เมื่อทำให้ชุดทดสอบแห้งสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือนซึ่งเพียงพอต่อการจัดเก็บสำหรับการตรวจสอบผลซ้ำหรือทวนสอบในภายหลังในกรณีที่ผู้ป่วยเกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือดทั้งในแบบเฉียบพลันและแบบล่าช้า โดยข้อดีและข้อจำกัดของชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง ได้แก่ 1) การเตรียมตัวอย่างเลือด วิธี PADs เตรียม 30%RBCs และวิธีหลอดทดลอง เตรียม 3-5%RBCs ในสารละลาย modified LISS 2) แอนติบอดีที่ใช้ วิธี PADs ใช้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร วิธีหลอดทดลอง ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร 3) วัสดุ วิธี PADs ทำจากกระดาษ ทำลายง่าย ราคาถูก วิธีหลอดทดลอง ใช้หลอดทดลองพลาสติก ใช้แล้วทิ้ง สิ้นเปลือง 4) เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา วิธี PADs 1-2 นาที วิธีหลอดทดลอง 5-15 นาที 5) ขั้นตอนการชะปฏิกิริยา วิธี PADs มี วิธีหลอดทดลอง ไม่มี 6) ปริมาตรของตัวอย่างเลือด วิธี PADs ใช้ 1.5 ไมโครลิตร วิธีหลอดทดลอง ใช้ 25 ไมโครลิตร 7) การอ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง วิธี PADs อ่านผลปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า วิธีหลอดทดลอง ต้องปั่นเหวี่ยงเพื่ออ่านผลปฏิกิริยา 8) การเก็บผลการทดสอบ วิธี PADs สามารถเก็บผลลการทดสอบไว้ได้นาน 3 เดือน สามารถสแกนหรือถ่ายรูปเก็บผลไว้ในประวัติของผู้ป่วยหรือผู้บริจาคโลหิตได้ วิธีหลอดทดลอง ไม่สามารถเก็บผลการทดสอบไว้ได้

Chulalongkorn University

การพัฒนาชุดทดสอบ RBC Ag-typing profile PADs สำหรับตรวจชนิดแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจโดยอาศัยหลักการการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและการชะปฏิกิริยาบนกระดาษเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Al-Tamimi M. และคณะ ปี ค.ศ. 2011 ที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh (D) บนกระดาษชำระ โดยตรึง anti-A, anti-B และ anti-D ไว้บนกระดาษ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วจึงหยดตัวอย่างเลือดครบส่วนลงไปบนแอนติบอดีที่ได้ตรึงไว้ให้ทำปฏิกิริยาและชะด้วย 0.9% normal saline นาน 10 นาที อ่านผลปฏิกิริยาจับกลุ่มที่เกิดขึ้น ซึ่งการใช้กระดาษชำระในการทดสอบหมู่เลือดทำให้เม็ดเลือดแดงที่ไม่เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มกับแอนติบอดีที่ตรึงไว้ถูกชะออกไปได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กระดาษซับและกระดาษกรอง แต่ไม่สะดวกต่อการใช้งานและการจัดเก็บ เนื่องจากกระดาษชำระมีความคงตัวน้อย อีกทั้งการไม่จำกัดขอบเขตบริเวณในการทำปฏิกิริยาของสารและท่อสำหรับรองรับการไหลในการชะปฏิกิริยาของสารที่ชัดเจนโดยการสร้างบริเวณที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษ ทำให้ไม่สามารถบังคับทิศทางการไหลของเม็ดเลือดแดงที่ไม่เกิดการจับกลุ่มและถูกชะได้จึงอ่านผลได้ยาก (10) การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงได้เลือกใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่มีอัตราการไหลที่ดี รวมทั้งการสร้างขอบเขตที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำบนกระดาษเพื่อเป็นพื้นที่ในการทำปฏิกิริยาของสารและจำกัดบริเวณในการทำปฏิกิริยา ซึ่งช่วยให้ลดปริมาตรแอนติบอดีที่และตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการตรวจได้ และการออกแบบให้มีท่อขนาดเล็กเพื่อเป็นพื้นที่ในการรองรับเม็ดเลือดแดงที่ถูกชะช่วยให้ลดเวลาในการชะปฏิกิริยาเหลือเพียง 5 นาที อีกทั้งการใช้กระดาษกรองยังสะดวกต่อการใช้งานจริง มีความคงตัวของชุดทดสอบ สามารถรองรับการตรวจตัวอย่างเลือดในปริมาณมากได้พร้อมกัน และยังสะดวกต่อการจัดเก็บผลการทดสอบ นอกจากนี้การพัฒนาวิธีตรวจแอนติเจนบนผิวของเม็ดเลือดแดงโดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษที่สำเร็จในงานวิจัยนี้ยังได้เป็นแนวทางในการต่อยอดสำหรับการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการตรวจแอนติเจนหมู่เลือดในระบบอื่นๆ ต่อไป เช่น ระบบ MNS หรือ Duffy เป็นต้น และที่สำคัญยิ่ง

Chulalongkorn University

งานวิจัยนี้เป็นความสำเร็จเบื้องต้นที่สามารถนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาร่วมกับภาคอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับใช้งานจริงในอนาคตได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ส่งผลให้โรงพยาบาลต่าง ๆ ภายในประเทศ และประเทศที่กำลังพัฒนาสามารถตรวจแอนติเจนชนิดต่างๆ บนผิวเม็ดเลือดแดงได้เอง ช่วยลดเวลาในการขอเลือดจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ทำให้ผู้ป่วยได้รับเลือดที่เร็วขึ้นและการรักษามี ประสิทธิภาพที่ดีมากยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

1. Allard S. Blood transfusion. Medicine. 2013;41(4):242-7.
2. Siegel DL. Chapter 12 - pretransfusion compatibility testing In: Silberstein CD, Hillyer KL, Hillyer FJ, Strobl LC, Jefferies L, editors. Handbook of Transfusion Medicine. San Diego: Academic Press; 2001. p. 107-14.
3. ศศิธร เพชรจันทร. Clinically significant of blood group antibody. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2548;15(4):211-5.
4. ภาวิณี คุปตวินทุ, มรกต เอมทิพย์, ดวงพร สังข์นุ่น, ภูรยา โอวาทกา, วิมล มานะกุล, สุดาวรรณ ลิ้มธรรมาภรณ์ และจินตนา ทับรอด. แอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2553;20(4):255-62.
5. อรัญญา วิริยะเสถียรกุล, วิชัย เหล่าสมบัติ, เบญจมาศ สัตยเสวนา, มาลัย ว่องชาญชัยเลิศ. Red blood cell alloimmunization in Thai thalassemic patients. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2542;8(4):273-8.
6. กาญจนา เอื้อตระกูลพูนสุข, ศศิธร เพชรจันทร, วิภาณี ลีหไพบูลย์สกุล, จริยา สายพิณ, วราภรณ์ สุรัตนรังสรรค์, พิศณุพงษ์ พลับจุ้ย. Detection of red cell antibodies by enzyme technique. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2542;9(2):103-10.
7. สุทัศน์ ฟู่เจริญ, วรวรรณ ตันไพจิตร, กิตติ ต่อจรัส, วิปร วิประกษิต, อรุโณทัย มีแก้วกุญชร, คณะบรรณาธิการ. แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย: การให้เลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และมาตรฐานของเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย. กรุงเทพฯ: พี.เอ.ลีฟวิ่ง จำกัด; 2557. หน้า. 19-24.

8. Castro O, Sandler SG, Houston-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. Transfusion. 2002;42(6):684-90.

9. Susan TJ, Tina MP. Chapter 5 - Pretransfusion compatibility testing. In: Luban CD, Hillyer RG. Strauss NL, editors. Handbook of Pediatric Transfusion Medicine. San Diego: Academic Press; 2004. p. 63-71.

10. Al-Tamimi M, Shen W, Zeineddine R, Tran H, Garnier G. Validation of paper-based assay for rapid blood typing. Anal Chem. 2012;84(3):1661-8.

11. Li M, Tian J, Al-Tamimi M, Shen W. Paper-based blood typing device that reports patient's blood type "in writing". Angew Chem Int Ed Engl. 2012;51(22):5497-501.

12. Rumsey DH, Ciesielski DJ. New protocols in serologic testing: a review of techniques to meet today’schallenges. J blood group sero and educ, American red cross. 2000;18(4):1-7.

13. Rodberg K. Antibody identification. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 318-41.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14. Aldridge ML. Compatibility testing. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 282-314.

15. Roback JD, Combs MR, Grossman BJ. Red cell typing. In: Hillyer CD, editor. The AABB Technical Manual. 16th ed. Brthesda, Maryland: AABB; 2008. p. 877-97.

16. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. มาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต: การจ่ายและให้โลหิต ส่วนประกอบของโลหิต และการให้ Rh immune globulin. 4th ed. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด อุดมศึกษา; 2558. หน้า. 42-53.

17. Barclay S. Chapter 4 - Red blood cell antigens and human blood groups. In: Luban CD, Hillyer RG. Strauss NL, editors. Handbook of Pediatric Transfusion Medicine. San Diego: Academic Press; 2004. p. 45-61.

18. Martin VL. Fundamentals of Immunology for Blood Bankers. In: Harmening DM, editor. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 4th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 1999. p. 36-65.

19. Storry JR. Modification of the red cell membrane and its application in blood group serology. J blood group serology and educ, American red cross. 2000;16(3):1-3.

20. Wilkinson SL. Secretor and soluble ABH antigens the Lewis, I, P and globoside blood group systems. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 86-98.

Chulalongkorn University

21. Leibach EK. Immunology: review and apllications. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 30-66.

22. Wilkinson SL. The Rh blood group system. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 100-15.

23. Wilkinson SL Other blood groups. In: Rudmann SV, editor. Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. p. 118-46.

24. Saw JM. The Rh blood group system. In: Harmening DM, editor. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 6th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2012. p. 149-71.

25. Leger RM. Blood group terminology and the other blood groups. In: Harmening DM, editor. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. 6 th ed. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2012. p. 172-215.

26. Westhoff CM, Shaz BH. Chapter 24 - Rh and RhAG blood group systems In: Abrams BH, Shaz CD, Hillyer M, Roshal CS, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2013. p. 157-62.

27. Westhoff CM, Shaz BH. Chapter 25 - Kell and Kidd blood group systems In: Abrams BH, Shaz CD, Hillyer M, Roshal CS, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2013. p. 163-6.

Chulalongkorn University

28. Westhoff CM, Shaz BH. Chapter 27 - Lewis, I, P1PK and GLOB blood group systems In: Abrams BH, Shaz CD, Hillyer M, Roshal CS, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2013. p. 171-6.

29. Daniels G PJ, de Silva M, Callaghan T, Mac Lennan S, Smith N. The clinical significance of blood group antibodies. Transfusion Med (Oxford, England). 2002;12(5):287-95.

30. Shaz BH. Chapter 19 - pretransfusion testing In: brams BH, Shaz CD, Hillyer M, Roshal CS, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. San Diego: Academic Press; 2009. p. 93-101.

31. Malomgre W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing. Anal and Bioanal Chem. 2009;393(5):1443-51.

32. จริยา สายพิณ. เทคนิคการตรวจแอนติบอดีของหมู่โลหิต. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2546;13(3):225-31.

33. Karim S. Chapter 19 - pretransfusion testing In: Abrams BH, Shaz CD, Hillyer M, Roshal CS, editors. Transfusion Medicine and Hemostasis. 2nd ed. San Diego: Elsevier; 2013. p. 117-26.

34. Hyono A, Mazda T, Okazaki H, Tadokoro K, Ohshima H. Analysis of enzyme-treated red blood cell surface and haemagglutination using a theory of soft-particle electrophoresis. Vox Sang. 2008;95(2):131-6.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

35. Martinez AW, Phillips ST, Wiley BJ, Gupta M, Whitesides GM. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. Angewandte Chemie (International ed in English). 2007;46(8):1318-20.

36. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. J Med Invest. 2008;55(3-4):174-82.

37. Li X BD, Shen W. A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. Biomicrofluidics. 2012;6(1):11301-1130113.

38. Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-cost printing of poly (dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. Anal Chem. 2008;80(9):3387-92.

39. Abe K, Suzuki K, Citterio D. Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. Anal Chem. 2008;80(18):6928-34.

40. Xia Y, Si J, Li Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. Biosens Bioelectron. 2016;77:774-89.

41. Martinez AW PS, Wiley BJ, Gupta M, Whitesides GM. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. Lab Chip. 2008;8(12):2146-50.

42. Fenton EM MM, Lopez GP, Sibbett SS. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. ACS Appl Mater Interfaces. 2009;1(1):124-9.

Chulalongkorn University

43. Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. Anal Chem. 2009;81(16):7091-5.

44. Lu Y, Shi W, Jiang L, Qin J, Lin B. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. Electrophoresis. 2009;30(9):1497-500.

45. Dungchai W, Chailapakul O, Henry CS. A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing. The Analyst. 2011;136(1):77-82.

46. Songjaroen T, Dungchai W, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. Talanta. 2011;85(5):2587-93.

47. Songok J, Tuominen M, Teisala H, Haapanen J, Makela J, Kuusipalo J, et al. Paper-based microfluidics: fabrication technique and dynamics of capillary-driven surface flow. ACS Appl Mater Interfaces. 2014;6(22):20060-6.

48. Choi S, Kim S-K, Lee G-J, Park H-K. Paper-based 3 D microfluidic device for multiple bioassays. Sensors and Actuators B: Chemical. 2015;219:245-50.

49. Liang W-H, Chu C-H, Yang R-J. Bio-sample detection on paper-based devices with inkjet printer-sprayed reagents. Talanta. 2015;145:6-11.

50. Talalak K, Noiphung J, Songjaroen T, Chailapakul O, Laiwattanapaisal W. A facile low-cost enzymatic paper-based assay for the determination of urine creatinine. Talanta. 2015;144:915-21.

Chulalongkorn University

51. Then WL, Li M, McLiesh H, Shen W, Garnier G. The detection of blood group phenotypes using paper diagnostics. Vox Sang. 2015;108(2):186-96.

52. Fischer C, Fraiwan A, Choi S. A 3D paper-based enzymatic fuel cell for self-powered, low-cost glucose monitoring. Biosensors and Bioelectronics. 2016;79:193-7.

53. Khan MS, Thouas G, Shen W, Whyte G, Garnier G. Paper diagnostic for instantaneous blood typing. Anal Chem. 2010;82(10):4158-64.

54. Guan L, Tian J, Cao R, Li M, Cai Z, Shen W. Barcode-like paper sensor for smartphone diagnostics: an application of blood typing. Anal Chem. 2014;86(22):11362-7.

55. Noiphung J, Talalak K, Hongwarittorrn I, Pupinyo N, Thirabowonkitphithan P, Laiwattanapaisal W. A novel paper-based assay for the simultaneous determination of Rh typing and forward and reverse ABO blood groups. Biosens Bioelectron. 2015;67:485-9.

56. Cheng CK, Lee CK, Lin CK. Clinically significant red blood cell antibodies in chronically transfused patients: a survey of Chinese thalassemia major patients and literature review. Transfusion. 2012;52(10):2220-4.

57. Dhawan HK, Kumawat V, Marwaha N, Sharma RR, Sachdev S, Bansal D, et al. Alloimmunization and autoimmunization in transfusion dependent thalassemia major patients: Study on 319 patients. Asian J Transfus Sci. 2014;8(2):84-8.

Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลาย 10 mM phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดย ชั่งสาร sodium chloride (NaCl, MW. 58.44) 8.0 กรัม potassium chloride (KCl, MW. 74.55) 0.2 กรัม di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, MW. 141.96) 1.44 กรัม และ potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4, MW. 138.08) 0.24 กรัม เทสารทั้งหมดลงในบีกเกอร์ ขนาดปริมาตร 500 ml. จากนั้นเติมน้ำกลั่น (distilled water, DW) ลงไปละลายสารโดยค่อยๆ เติมลงไป แล้วคนให้สารละลายช้าๆ เมื่อสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเทสารละลายลงไปในขวดรูปชมพู่ (volumetric flask) ขนาดปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml. ด้วยกระบอกตวงและเติมลงในสารละลาย นำมาปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยกรด HCl แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบปริมาตร 1 ลิตร นำสารละลายที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วใส่ในขวด duran ขนาดปริมาตร 1 ลิตร นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 1-6 °C

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. การเตรียมสารละลาย 6% bovine serum albumin (6%BSA) w/v ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมโดย ชั่งสาร bovine serum albumin 6 กรัม เทลงในบีกเกอร์ ขนาดปริมาตร 100 ml. จากนั้นเติม PBS pH 7.4 ลงไปละลายสาร โดยค่อยๆ เติมลงไป แล้วคนให้สารละลายช้าๆ เมื่อสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเทสารละลายลงไปในขวดรูปชมพู่ (volumetric flask) ขนาดปริมาตร 100 ml. แล้วจึงเติม PBS ลงไปให้ครบปริมาตร 100 ml. และนำสารละลายที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปใส่ในขวด duran ขนาดปริมาตร 100 ml. แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 1-6 °C

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิภาดา ชนาเกียรติ เกิดเมื่อวันที่ 12 เมษายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 ขณะที่ศึกษานั้นได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน ประจำปีการศึกษา 2557 จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประสบการณ์ทำงาน

2553-ปัจจุบัน นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ หน่วยงานธนาคารเลือด กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ผลงานวิจัย

วิภาดา ชนาเกียรติ, ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช และวนิดา หลายวัฒนไพศาล. การพัฒนาวิธีตรวจชนิดของแอนติเจนหมู่เลือดโดยใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ฐานกระดาษ. วารสารเทคนิคการแพทย์.2559;44(1):5496-507.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University