แผนกพยาธิวิทยา

โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน

เรื่อง การตรวจหมู่โลหิตระบบเอบีโอ (ABO)

WI-LAB-089

แก้ไขครั้งที่ 3

ผู้จัดทำ ร.ต.

(ศาสตร์ศิลป์ ไชยพงศ์)

ผู้จัดการวิชาการสาขาธนาคารโลหิต

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง

(อรกัญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้ : 1 กุมภาพันธ์ 256

1. **วัตถุประสงค์ของการทดสอบ**

เพื่อตรวจหาหมู่โลหิต ABO ที่ถูกต้องของผู้ป่วย ซึ่งเป็นหมู่โลหิตหลักที่มีความสำคัญต่อการทดสอบความเข้ากันได้ของเลือดและเพื่อเตรียมโลหิตที่ตรงหมู่ ABO ให้ผู้ป่วย สำหรับหมู่โลหิตระบบ ABO การที่จะบอกว่าเป็นหมู่โลหิตใดนั้น ต้องตรวจ 2 วิธี ให้ได้ผลตรงกันคือ cell grouping ซึ่งเป็นการตรวจหา antigen บนเม็ดเลือดแดง และ Serum grouping ซึ่งเป็นการตรวจหา antibody ใน serum ซึ่งต้องได้ผลสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี โดยอาศัยหลักการหลอดทดลอง (Test tube method)

2. **หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ**

2.1. ปฏิกิริยาจับกลุ่ม (agglutination) : เริ่มต้นด้วย antibody จะไปจับ antigen บนผิวเม็ดเลือดแดง เป็น specific immunochemical reaction หรือ sensitization ซึ่ง complement อาจมีบทบาทร่วมด้วยในขั้นตอนนี้ ขั้นตอนถัดมาเป็น physical process ของ agglutination ซึ่งเป็นผลมาจากการจับกลุ่มของเซลล์ที่ถูก sensitized แล้วเซลล์แต่ละเซลล์เกาะจับกันโดยมี antibody เป็นสะพาน

2.2. ปฏิกิริยาการแตกสลาย (hemolysis) : Antibody ของหมู่โลหิตบางชนิดสามารถกระตุ้นระบบ complement เมื่อทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกัน ทำให้มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง antibody ที่มีคุณสมบัติเช่นนี้เรียกว่า hemolysin ถ้าไม่มี complement ก็จะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม หรือเพียงแต่มีการ sensitize เม็ดเลือดแดงที่มี antigen ตรงกันเท่านั้น antibody เหล่านี้ได้แก่ anti-A, Anti-B, Anti-A,B, Anti-I, Anti-I, Anti-Le^a, Anti-Le^b, Anti-Le^X, Ant- Jk^a , Ant- Jk^b, Ant- $PP1P^k(Tj^a)$ และ Anti-Vel antibody บางชนิดในกลุ่มนี้อาจทำให้มีการจับของ complement บนเม็ดเลือดแดง โดยไม่ทำให้เกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงก็ได้

2.3. Cell grouping

หลักการของวิธีหลอดทดลอง (Test tube method) สำหรับ ABO/Rh cell grouping : น้ำยา Standard anti-A, anti-B และ anti-AB มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ Antigen A หรือ Antigen B ทำให้เกิดการจับกลุ่มและแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจนและรวดเร็วในหลอดทดลองแม้มีจำนวนเซลล์น้อย โดยเฉพาะกรณีที่มีปัญหาจากเม็ดเลือดแดง เช่น มีแอนติเจนน้อย (weak) เป็นต้น

2.3 Serum grouping

เป็นการตรวจหา anti-A และ/หรือ anti-B และ/หรือ anti-AB ใน Serum หรือ Plasma ของผู้ป่วยจะทำให้เม็ดเลือดแดงที่มี antigen ตรงกันเกิดการแตก (hemolysis) หรือจับกลุ่ม (agglutination) เช่น anti-A จะทำให้เซลล์ที่มี antigen A เท่านั้น ได้แก่ cell A และ cell AB แตกหรือจับกลุ่ม แต่จะไม่ทำให้เซลล์ที่ไม่มี antigen A เกิดปฏิกิริยาใดๆ โดยหลักการของวิธีหลอดทดลอง (Test tube method) สำหรับ ABO serum grouping : anti-A และ anti-B ที่ต้องการทดสอบจะทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีแอนติเจนตรงกันจับกลุ่มมากน้อยต่างกัน ขึ้นกับความแรงของ

antibody ของแต่ละคน การใช้หลอดทดลองและการปั่นจะช่วยให้เห็นปฏิกิริยาน้อยๆได้ในเวลารวดเร็ว

3. **ลักษณะทางประสิทธิภาพ :** การทดสอบคุณภาพน้ำยาตรวจหาหมู่เลือด (Potency and Avidity test)

3.1. วิธีปฏิบัติการตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-A (Titration of Anti-A)

3.1.1 ทำ Two-fold Dilution ของน้ำยา Anti-A ที่จะตรวจสอบคุณภาพ

3.1.1.1 เขียนระบุใน tube ที่ 1 เป็น 1:2, tube ที่ 2 เป็น 1:4 จนถึง tube ที่ 10 เป็น 1:1024 โดยปิเปต 0.9% NSS ในทุก tube tube ละ 100 µl

3.1.1.2 ปิเปต Anti-A ที่ต้องการทดสอบ 100 µl ลงใน tube ที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน (ทิ้ง Tip)

3.1.1.3 ใช้ Tip อันใหม่ทำการปิเปต 100 µl จาก tube ที่ 1 ลงใน tube ที่ 2 และเขย่าให้เข้ากัน

3.1.1.4 ทำการปิเปตไปเรื่อยๆ จนครบทุก tube tube สุดท้ายปิเปต 100 µl ทิ้ง

3.1.1.5 หยด 3% A-cells ลงไปทุก tube tube ละ 1 หยด

3.1.1.6 ปั่นอ่านด้วยเครื่อง Serofuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ calibrate ไว้ เช่น ปั่นนาน 15 วินาที เมื่อใช้ความเร็ว 3,400 รอบ/นาที

3.2.2 การตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-B (Titration of Anti-B) ทำเช่นเดียวกันกับการหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-B แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 3% B-cells แทน 3% A-cells

3.2.3 การตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-A, B (Titration of Anti-A,B) ทำเช่นเดียวกันกับการหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-A, B แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 3% A-cells และ ใช้ 3% B-cells

3.2.4 การตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-D (Titration of Anti-D) ทำเช่นเดียวกันกับการตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-D แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 3% O1(D+) – cells แทน 3% A-cells

3.2 การตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Anti-A (Avidity of Anti-A)

3.2.1 หยด Anti-A ที่ต้องการตรวจสอบลงบน glass slide

3.2.2 หยด A-cells ความเข้มข้น 30% (pack red cells ของ A-cells 30 µl + 0.9%NSS 70 µl) ลงไปบน glass slide 1 หยด

3.2.3 ใช้หลอดพลาสติกคนให้ 30% A-cells และ Anti-A ให้เข้ากันเป็นวงกว้างประมาณ 2.5 cm

3.2.4 จับเวลาตั้งแต่เริ่มคนจนเห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

3.2.5 การตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Anti-B (Avidity of Anti-B) ทำเช่นเดียวกันกับการหา Avidity ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-B แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 30% B-cells แทน 30% A-cells

3.2.6 การตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Anti-A,B (Avidity of Anti-A,B) ทำเช่นเดียวกันกับการหา Avidity ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-A, B แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 30% B-cells แทน 30% A-cells

3.2.7 การตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Anti-D (Avidity of Anti-D) ทำเช่นเดียวกันกับการหา Avidity ของน้ำยา Anti-A แต่ใช้น้ำยา Anti-D แทนน้ำยา Anti-A และใช้ 30% O1(D+)-cells แทน 30% A-cells

3.3 การอ่านผล

3.3.1 การอ่านผลการตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยาแอนติซีรั่ม (Titration of Anti-Serum) อ่านผลไตเตอร์โดยดู dilution สูงสุด ที่สามารถเห็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า จดบันทึกผลการทดสอบที่อ่านได้

3.3.2 การอ่านผลการตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยาแอนติซีรั่ม(Avidity of Anti-Serum) อ่านผลโดยจับเวลาตั้งแต่เริ่มคนให้เซลล์และ Anti-serum ทำปฏิกิริยากันจนกระทั่งถึงเริ่มมองเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า จดบันทึกผลการทดสอบที่อ่านได้

3.4 การแปลผลจากผลการตรวจ (Interpretation of results)

3.4.1 การแปลผลการตรวจหาไตเตอร์ของน้ำยา Anti-serum ที่ควรใช้ต้องมี titer ไม่ต่ำกว่ากำหนด ดังนี้

แอนติซีรั่ม	หมู่เลือด	แอนติซีรั่มที่ควรใช้ต้องมี titer ไม่ต่ำกว่า
Anti-A	A_1	256
Anti-B	B	256
Anti-AB	B	256
Anti-D	O Rh(D) positive	64

3.4.2 การตรวจหาความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยา Anti-serum

แอนติซีรั่ม	หมู่เลือด	แอนติซีรั่มที่ควรใช้ต้องมี Avidity ไม่สูงกว่า(วินาที)
Anti-A	A_1	15
Anti-B	B	15
Anti-AB	B	15
Anti-D	O (D+)	60

4. **ประเภทของกลุ่มตัวอย่าง**

4.1. ตัวอย่างเริ่มต้น (primary sample) ได้แก่ เลือด (Blood) ที่เจาะโดยใช้ภาชนะบรรจุที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA

4.2. ชนิดตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (analytical sample) ได้แก่ Plasma หรือ Red Blood Cell

4.2.1 การตรวจ Cell grouping (หา antigen A, Antigen B) ใช้ Red blood cells suspension

4.2.2 การตรวจ Serum grouping (หา Anti-A และ/หรือ anti-B และ/หรือ anti-B) ใช้ plasma ที่ไม่มี hemolysis

4.3. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

4.3.1 การเตรียม plasma ให้ทำการปั่นแยกออกจากเซลล์เม็ดเลือดด้วยความเร็ว 3,000 – 3,500 rpm นาน 10-15 นาที ให้ได้ plasma ที่ไม่มีก้อน clot ปนมา และไม่มี hemolysis

4.3.2 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงควรล้างด้วย physiological saline ก่อนจะมาเตรียม suspension โดยการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จะใช้ตรวจ Cell grouping ด้วย Tube test method ให้ pipette ตัวอย่าง packed red cells จำนวน 30 uL ผสมกับ 0.9% NSS. จำนวน 970 uL จะได้ 3% cell suspension

กรณีสิ่งส่งตรวจเป็นโลหิตของทารก (อายุไม่เกิน 4 เดือน) ให้เตรียมตัวอย่างที่จะใช้ตรวจเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจเฉพาะ cell grouping เท่านั้น และใช้ plasma มารดาเพื่อตรวจหา unexpected antibody

4.4 การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ

4.4.1 ควรใช้ plasma ที่ปั่นแยกออกมาใหม่จากเลือดที่เก็บมาใหม่

4.4.2 การต้องการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเพื่อใช้ตรวจสอบหมู่โลหิตซ้ำ ให้เก็บไว้ที่ตู้เย็น (2-8 °C) 7 วัน

4.5 เงื่อนไขต่างๆที่ไม่ยอมรับสิ่งส่งตรวจ

4.5.1 เลือดที่มีการปนเปื้อน

4.5.2 เลือดที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง

4.5.3 สิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเก็บรักษาไม่ถูกวิธี ได้แก่

4.5.3.1 ใช้ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจไม่ถูกต้อง

4.5.3.2 ภาชนะที่ใช้บรรจุมีการรั่วซึมหรือปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ เช่น เส้นผม แมลง ฯลฯ

4.5.3.3 การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิหรือระยะเวลารอนำส่งที่อาจทำให้ตัวอย่างเลือดเสื่อมสภาพ

4.5.4 ข้อมูลที่ใช้ชี้บ่งตัวอย่างเลือดไม่ถูกต้องหรือไม่สมบูรณ์ เช่น ไม่ติดฉลากชี้บ่งตัวอย่างผู้ป่วย ชี้บ่ง ชื่อ-สกุล/HN/อายุ/วันเดือนปีที่เจาะเก็บเลือดผู้ป่วยไม่ชัดเจนหรือไม่ครบถ้วน เป็นต้น

5. **การเตรียมผู้ป่วย**

ไม่ต้องมีการงดน้ำงดอาหาร

6. **ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง**

EDTA Blood collection tube

7. **เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี**

7.1 DG Gel Sol.

7.2 น้ำยา Anti-A, Anti-B, Anti-A,B ชนิด monoclonal reagent จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

7.3 Reagent red blood cell for reverse group test (3% Standard A-cell, B-Cell, O-cell ที่เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)

7.4 Anti Human globulin serum (AHG reagent)

7.5 Coombs' control cells ที่เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

7.6 น้ำเกลือปกติ (0.9%NSS.)

7.7 Serofuge centrifuge

7.8 Automatic pipettes ขนาด 10 uL, 25 uL, 50 uL and 200 uL พร้อม Disposable tips

7.9 Glass test tube ขนาด 10 x 75 มม.

8. **สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย**

ต้องสวมถุงมือยางและเสื้อคลุมขณะปฏิบัติงานเพื่อป้องกันการติดเชื้อบางชนิดที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างตรวจ

9. **ขั้นตอนการสอบเทียบ**

9.1 เครื่อง Centrifuge for DG Gel cards (Diana Fuge)

ได้รับการสอบเทียบจากบริษัท วีนัส เทคโนโลยี จำกัด และกองคลังแพทย์ กรมแพทย์ทหารบก ซึ่งจะดำเนินการสอบเทียบปีละ 1 ครั้ง โดยมีข้อกำหนดการสอบเทียบคือ สอบเทียบตามช่วงที่ใช้งาน คือ ความเร็ว 1100 rpm เวลา 9 นาที

9.2 Serofuge centrifuge

ผู้รับผิดชอบงานธนาคารโลหิต ต้องทำการปรับเครื่องปั่นเพื่ออ่านปฏิกิริยาและล้างเซลล์ตามวงรอบที่กำหนดคือทุก 6 เดือน ดังนี้

9.2.1 การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

a. เจือจาง Anti-A ด้วย 0.9% NSS โดยให้ทำปฏิกิริยากับ 3% A-cells ให้ผลเท่ากับ 1+

b. เตรียมหลอดทดลองขนาด 10x75 มม. สำหรับ Positive control และ Negative control อย่างละ 5 หลอด

c. เขียนกำกับข้างหลอด 15, 30, 45, 60 และ 90 วินาที ตามลำดับ

d. หยด Anti-A ที่เจือจางแล้ว 2 หยด ลงในทุกหลอดทดลอง

e. หยด 3% A-cells 1 หยดลงในหลอดที่เป็น Positive control และ 3% B-cells 1 หยดลงในหลอดที่เป็น Negative control

f. เขย่าให้เข้ากันและปั่นอ่านผลพร้อมกันทั้งคู่ โดยใช้เวลาปั่น 15, 30, 45, 60 และ 90 วินาที ตามลำดับ

g. บันทึกผลลงในตาราง ถ้าให้ผลตรงตามข้อกำหนด ให้ลงผล Y (yes) แต่ถ้าไม่ได้ผลตรงตามข้อกำหนด ให้ใส่ N (no)

9.2.2 การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนของ Antiglobulin test

a. ใช้เซลล์จากข้อ 9.2.1 ที่เป็น Negative control หรือ Positive control อย่างใดอย่างหนึ่ง จำนวน 5 หลอด

b. เติม 0.9%NSS ประมาณ 3/4 ของหลอด

c. นำไปปั่นโดยใช้เวลาปั่น 15, 30, 45, 60, และ 90 วินาทีตามลำดับ

d. บันทึกผลลงในตาราง ถ้าให้ผลตรงตามข้อกำหนด ให้ลงผล Y (yes) แต่ถ้าไม่ได้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ใส่ N (no)

9.2.3 การอ่านผล

การหาเวลาระยะเวลาที่เหมาะสมในการปั่นอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง คือ ระยะเวลาน้อยที่สุดที่ให้ผลครบตามข้อกำหนดทุกข้อ (ตอบ yes ครบทุกข้อ)

9.2.3.1 ปั่นที่เหมาะสมเพื่อการอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและทำการบันทึกผลลงในตาราง ถ้าให้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ลงผล Y(yes) แต่ถ้าไม่ได้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ใส่ N (no)

ลักษณะหลังปั่น	**หลอด**	**เวลาปั่น (วินาที)**				
		15s	**30s**	**45s**	**60s**	**90s**
1. น้ำส่วนบนใส	Positive					
	Negative					
2. เซลล์มารวมที่ก้นหลอดมีขอบวงชัดเจน	Positive					
	Negative					
3. เขย่าเบ่าๆแล้วเซลล์หลุดจากก้นหลอด	Positive					
	Negative					
4. ความแรงของปฏิกิริยา ผล negative control = neg	Positive					
	Negative					

9.2.3.2 การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนของ Antiglobulin test

บันทึกผลลงในตาราง ถ้าให้ผลตรงตามข้อกำหนด ให้ลงผล Y (yes) แต่ถ้าไม่ได้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ใส่ N (no)

ลักษณะหลังปั่น	เวลาปั่น (วินาที)				
	15 s	30 s	45 s	60 s	90s
1. น้ำส่วนบนใส					
2. เม็ดกระดุมเซลล์มีขอบชัดและเซลล์ติดข้างหลอดน้อย					
เทน้ำใสทิ้ง - สังเกต					
3. เม็ดกระดุมเซลล์หลุดจากก้นหลอดง่าย					
4. ปริมาณเซลล์เหลือใกล้เคียงกับตอนก่อนล้าง					

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการปั่นอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง คือระยะเวลาน้อยที่สุดที่ให้ผลครบตามข้อกำหนดทุกข้อ (ตอบ yes ครบทุกข้อ)

10. **ขั้นตอนของกระบวนการ**

10.1 การตรวจหาหมู่โลหิตด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

10.1.1 วิธีการตรวจ Cell grouping

a. เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 3 หลอด เขียน “A” , “B” “AB”

b. หยด Anti-A, Anti-B และ Anti-AB อย่างละ 2 หยด ลงในหลอดทดลอง ข้อ a.

c. เติม 3% cell suspension ของผู้ป่วยที่จะทดสอบใน 0.9% NSS หยดลงในข้อ a. หลอดละ 25 µl แล้วเขย่าให้เข้ากัน

d. ปั่นอ่านผล ด้วย Serofuge centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ได้ calibrate ไว้

10.1.2 วิธีการตรวจ Serum grouping

a. เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 4 หลอดเขียน “AC” , “BC”, “OC” อย่างละหลอด

b. หยด serum ของผู้ป่วยที่จะทดสอบลงไปทั้ง 4 หลอดๆ ละ 50 uL

c. เติม 3% A cells ลงในหลอด “AC” 1 หยด

d. เติม 3% B cells ลงในหลอด “BC” 1 หยด

e. เติม 3% O cells ลงในหลอด “OC” 1 หยด

f. ปั่นอ่านผล ด้วย Serofuge centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ได้ calibrate ไว้

11. **ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ**

ทำการควบคุมคุณภาพภายในเดือนละ 1 ครั้ง หรือในวันที่มีการขอใช้โลหิตครั้งแรกของวันนั้น โดยทำเหมือนกับการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย วัสดุและน้ำยาที่ใช้ประกอบด้วยดังนี้

a. น้ำยา Anti-A, Anti-B, Anti-A,B ชนิด monoclonal reagent
b. Reagent red blood cell for reverse group test (3% Standard A-cell, B-Cell, O-cell ที่เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
c. น้ำเกลือปกติ (0.9% NSS.)
d. Glass test tube ขนาด 10 x 75 มม.

11.1 การควบคุมคุณภาพภายในการตรวจหาหมู่โลหิตด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

11.1.1 เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 11 หลอด วางใน rack พร้อมเขียนกำกับที่ หลอดทดลอง และหยดน้ำยาและเซลล์ ดังตาราง และทำการปั่นอ่านผล ด้วย Serofuge centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ได้ calibrate ไว้

11.1.2 น้ำยา Anti sera ให้ใช้ 50 µl ทำปฏิกิริยากับ standard cells 1 หยด

การควบคุมคุณภาพน้ำยาตรวจหาหมู่โลหิต	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	AHG 37 °C, 30 M ⇨	CCC ⇨
	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Anti-D	Anti-D		
A cells	H/3+, 4+	Neg	H/ 3+, 4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B cells	-	-	-	Neg	H/3+, 4+	H/3+, 4+	-	-	-	-	-	-	-
O cells	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	Neg	H/ 3+, 4+	-	-	-
Rh(D) Negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Neg	Neg	2+

12. **การประเมินคุณภาพจากองค์กรภายนอก (External quality assessment, EQA)**

12.1 เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพระหว่างองค์กร (External Quality Assessment Schemes,EQAS) : โครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาธนาคารเลือด โดยสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

12.2 ดำเนินการตรวจตามความถี่ปีละ 3 ครั้ง ครั้งละ 2 ตัวอย่าง รวม 6 ตัวอย่าง

12.3 เมื่อได้รับวัตถุทดสอบแล้วให้ทำการตรวจสอบคุณภาพวัตถุทดสอบทันที ในกรณีที่ยังไม่ทำการทดสอบต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิระหว่าง 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส

12.4 ส่งรายงานผลภายในเวลาที่กำหนด

12.5 เมื่อได้รับการรายงานผลให้ผู้ตรวจวิเคราะห์ทำการตรวจสอบผลการประเมิน กรณีผลการตรวจอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับคุณภาพ (Standard Score 4.00 ; Excellent) ให้ผู้ตรวจวิเคราะห์ทำการเขียนบันทึก

ลงในเอกสารการประเมินผล กรณีไม่ผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับ ให้ผู้ตรวจวิเคราะห์ทำการบันทึกในฟอร์ม “บันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA/PT ไม่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ”(FM-Lab-020)

13. **สิ่งรบกวน**

13.1 Serum Hemolysis จะทำให้การแปลผลหมู่เลือดผิดพลาดได้ เนื่องจากการแปลผลหมู่เลือด จะดูจากปฏิกิริยาการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) และ การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination)

13.2 Protein บางชนิด ได้แก่ Wharton’s jelly ใน newborn cord blood, cold action autoimmune antibodies, protein ที่เข้มข้นกว่าปกติ ทำให้เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มหรือซ้อนกัน ทำให้แปลผลยาก ควรล้างเซลล์ก่อน 1 ครั้ง

14. **หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องอาทิความไม่แน่นอนของการวัด**

ไม่มี

15. **ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก**

ไม่มี

16. **ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้**

16.1 การอ่านผลหมู่โลหิตด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

16.1.1 การอ่านผลวิธี cell grouping

16.1.1.1 เอียงหลอดเขย่าเบาๆให้หลุดจากก้นหลอด เพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า

ผลบวก (Positive) คือ มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ผลลบ (Negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

16.1.2 การอ่านผลของวิธี serum grouping

16.1.2.1 ดู hemolysis ก่อนทันทีหลังปั่น แล้วดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า โดยเอียงหลอดเขย่าเบาๆให้เซลล์หลุดจากก้นหลอด

ผลบวก (positive) คือ มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination) และ มี/ไม่มี hemolysis หรือมี hemolysis อย่างเดียว

ผลลบ (Negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและไม่มี hemolysis

16.1.3 การให้เกรดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและปฏิกิริยาฮีโมไลซิสของเม็ดเลือดแดง

4 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส

3 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส

2 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส

1 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กมากหลายก้อน น้ำขุ่น

W + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กมากหลายๆก้อน น้ำขุ่นและมีสีชมพู เห็นได้ชัดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

H (Complete hemolytic) มี hemolysis หมด น้ำเป็นสีแดงและไม่มีเซลล์เหลืออยู่

PH (Partial hemolytic) มี hemolysis บางส่วน น้ำเป็นสีแดง มีเซลล์จับกลุ่มเหลืออยู่ก้นหลอด

17. **คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด**

ไม่มี

18. **ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม**

ไม่มี

19. **การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ** : Test tube method

Cell grouping			Serum grouping			หมู่โลหิต
Anti–A	Anti–B	Anti–A,B	A Cell	B Cell	O Cell	ABO
+	0	+	0	+	0	A
0	+	+	+	0	0	B
+	+	+	0	0	0	AB
0	0	0	+	+	0	O

\+ คือผลบวก (positive) : มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และมี/ไม่มี hemolysis หรือมี hemolysis อย่างเดียว

0 คือผลลบ (negative) : ไม่มีการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงและไม่มี hemolysis

โดยปกติทั่วไป Anti-A, Anti-B ที่ไม่เสื่อมสภาพจะให้ปฏิกิริยาแรง 3+ ถึง 4+ ยกเว้นในทารกหรือโรคบางชนิด

20. **แหล่งที่มาของค่าแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น**

20.1 Reagent

20.1.1 ใช้หรือหยิบน้ำยาผิด

20.1.2 ลืมหยดน้ำยา

20.1.3 Gel เสื่อมสภาพหรือหมดอายุ แห้ง แตก น้ำยาระเหย

20.2 การอ่านผล

20.2.1 การอ่านผลเร็วเกินไป ทำให้ปฏิกิริยาการจับกลุ่มไม่สมบูรณ์ทำให้อ่านเป็นผลลบปลอมได้

20.2.2 การเอียงหลอดแล้วเขย่าแรงเกินไป ทำให้ agglutination กระจายหายไป อ่านเป็นผลลบปลอมได้

20.3 ลักษณะสิ่งส่งตรวจ

20.3.1 การเกิด fibrin ในตัวอย่างเลือดที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด หรือผู้ป่วยโรคไต กล่าวคือเลือดไม่แข็งตัวเต็มที่ในเวลาปกติ แต่เกิด clot ขึ้นอีกเรื่อยๆโดยเฉพาะเมื่อ

incubate เลือดที่ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เม็ดเลือดแดงจับตัวกันเป็นสายหรือก้อนเล็ก ซึ่งจะรบกวนการอ่านปฏิกิริยา agglutination การแก้ไขคือ ให้หยด dry thrombin โดยใช้ไม้เขี่ยผง thrombin ติดปลายไม้ใส่ลงใน whole blood หรือ Serum ในหลอดตัวอย่างเลือด หรือหยด 1 หยด แต่ถ้าใช้ thrombin solution ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ ให้ผสม thrombin solution กับ whole blood แล้วตั้งทิ้งไว้ เมื่อเกิด clot ให้เขี่ย fibrin ทิ้งไป แล้วนำ serum ที่เหลือไปตรวจวิเคราะห์ได้ แต่ให้ระวังหากใส่ thrombin solution มากเกินไปจะทำให้เกิด nonspecific agglutination ได้

21. **เอกสารอ้างอิง**

21.1 มาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (EX-LAB-008)

21.2 คู่มือปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การบริการโลหิค ของสภาเทคนิคการพทย์ (EX-LAB-009)

21.3 เอกสารกำกับน้ำยาตรวจหมู่โลหิต Anti-A, Anti-B และ Anti-A,B ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-151)

21.4 เอกสารกำกับน้ำยา Screening cells and Panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-152)

21.5 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา Anti-A ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-153)

21.6 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา Anti-B ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-154)

21.7 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา Anti-AB ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-155)

21.8 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา 3% screening cells (O1, O2, O3) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-156)

21.9 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา 3% A cells, 3% B cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-157)

21.10 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา 3% Coombs control cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-158)

21.11 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา 3% Rh(D) negative Control Cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-159)

22. **ภาคผนวก : -**

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-089 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจหมู่โลหิตระบบเอบีโอ (ABO)

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
11 พ.ย.62	0	ฉบับแรก	นายศาสตร์ศิลป์
1 พ.ย. 63	1	แก้ไข ข้อ 12. การประเมินคุณภาพจากองค์กรภายนอก (External quality assessment, EQA) ข้อย่อย 12.5 เกี่ยวกับเกณฑ์ยอมรับคุณภาพ จากเดิม Standard Score ≥ 3.0 : Satisfactory เปลี่ยนเป็น Standard Score 4.0 : Excellent	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์
1 ก.ย. 64	2	แก้ไขทั้งฉบับ - ยกเลิกวิธีการตรวจหมู่เลือดระบบเอบีโอด้วยวิธีเจล (Gel technique) - แก้ไข ประเภทของกลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างเริ่มต้น (primary sample) ได้แก่ เลือด (Blood) ที่เจาะโดยใช้หลอดบรรจุที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA - แก้ไข ข้อ 4 ประเภทของกลุ่มตัวอย่าง ข้อย่อย 4.2 ชนิดตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ (analytical sample) ได้แก่ Plasma หรือ Red Blood Cell - แก้ไข การเตรียมสิ่งส่งตรวจ การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่จะใช้ตรวจ Cell grouping ด้วย Tube test method (pipette ตัวอย่าง packed red cells จำนวน 30 uL ผสมกับ 0.9% NSS. จำนวน 970 uL จะได้ 3% cell suspension) จากเดิม 5% cell suspension - แก้ไข ความเข้มข้นของ Standard A cells, B cells, O cells จากเดิม 2-5% เป็น 3% cell suspension ตามที่ระบุในเอกสาร certificate of analysis ที่เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย - ระบุความเข้มข้นของ normal saline solution เป็น 0.9% normal saline solution - เพิ่ม ข้อ 3. ลักษณะทางประสิทธิภาพ : การทดสอบคุณภาพน้ำยาตรวจหาหมู่เลือด (Potency and Avidity test)	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
		- แก้ไข ข้อ 9 ขั้นตอนการสอบเทียบ การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง จากทุก 2 เดือน เป็น ทุก 6 เดือน - แก้ไข ข้อ 11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ทำการควบคุมคุณภาพภายในเดือนละ 1 ครั้ง โดยเพิ่มหรือในวันที่มีการขอใช้โลหิตครั้งแรกของวันนั้น - เพิ่มเอกสารอ้างอิง ข้อ 22. ประกอบด้วย เอกสารอ้างอิงมาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (EX-LAB-008) และคู่มือปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การบริการโลหิค ของสภาเทคนิคการพทย์ (EX-LAB-009)	
1 ก.พ. 66	3	- แก้ไข 10.1.2 วิธีการตรวจ Serum grouping ข้อ e. เปลี่ยนจาก 3% O1cells, 3% O2 cells เป็น 3% O cells - เปลี่ยนเอกสารอ้างอิง 21.8 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา 3% screening cells (O1, O2) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-156) เปลี่ยนเป็น 3% screening cells (O1, O2, O3) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์