แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง การตรวจหมู่โลหิต Rh D Typing
WI-LAB-090

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 2566

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อให้ทราบหมู่โลหิตระบบ Rh ที่ถูกต้องของผู้ป่วย ซึ่งเป็นหมู่โลหิตที่มีความสำคัญต่อการทดสอบความเข้ากันได้ของโลหิต และเป็นการทดสอบที่สำคัญและต้องตรวจทุกครั้งเพื่อเตรียมโลหิตให้แก่ให้ผู้ป่วย

2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ

เนื่องจากแอนติเจน D ในระบบ Rh เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญรองลงมาจากแอนติเจน A และ B ในระบบ ABO โดย anti-D จะเกิดก่อต่อเมื่อได้รับเลือด หรือในหญิงตั้งครรภ์ลูกที่มีแอนติเจน D ซึ่งถ่ายทอดมาจากพ่อ และเนื่องจากแอนติเจน D มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง antibody ได้ดีมาก คนที่ไม่มีแอนติเจน D หรือ D-negative จะถูกกระตุ้นให้สร้าง anti-D ได้มากกว่า 80% ของคน D-negative ทั้งหมด ดังนั้น จึงต้องตรวจหาแอนติเจน D ทั้งในผู้บริจาคและผู้ป่วยในงานประจำ โดยเฉพาะในผู้ป่วยต้องทราบว่าเป็น D-negative หรือไม่ เพื่อให้เลือดที่เป็น D-Negative ที่ตรงกัน ซึ่งเป็นการป้องกัน immunization จากแอนติเจน D การตรวจ D antigen โดยใช้ anti-D ตรวจด้วย วิธีหลอดทดลอง (test tube method)

หลักการของวิธีหลอดทดลองสำหรับ Rh cell grouping : น้ำยา Standard anti-D (Monoclonal antibody) มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ Antigen D ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการจับกลุ่มและแสดงปฏิกิริยาได้ชัดเจนในหลอดทดลอง

หมายเหตุ : การตรวจหาหมู่โลหิตระบบ Rh โดยทั่วไปหมายถึงการตรวจ D antigen ของเม็ดเลือดแดง เพื่อบ่งชี้การเป็น Rh positive หรือ Rh negative โดยดูปฏิกิริยาของเม็ดเลือดแดงกับ anti-D ส่วนการตรวจ Rh antigen ตัวอื่นๆ เช่น C, E, c, e ก็ใช้ anti-C, anti-E, anti-c, และ anti-e มาทดสอบกับเม็ดเลือดแดงตามลำดับ

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 และ Red blood cells suspension

4.3. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

4.3.1. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells suspension) ถ้าจะนำเม็ดเลือดแดงจากถุงเก็บเลือดมาใช้ควรล้างด้วย physiological saline ก่อนจะมาเตรียม suspension

4.3.1.1. การเตรียมเม็ดเลือดแดงที่จะใช้ตรวจ 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

4.4 การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการ

4.4.1 การเก็บรักษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยเพื่อใช้ตรวจสอบหมู่โลหิตซ้ำกรณีมีปัญหา

4.4.1.1 ต้องเก็บสายถุงโลหิตหรือตัวอย่างโลหิตของโลหิตครบส่วนและเม็ดโลหิตแดง ไว้ที่ตู้เย็น (2-8 °C) อย่างน้อย 7 วัน เมื่อให้โลหิตผู้ป่วยแล้ว

4.4.1.2 เก็บตัวอย่างโลหิตของผู้ป่วยไว้ที่ตู้เย็น (2-8 °C) 7 วัน เมื่อให้โลหิตผู้ป่วยแล้ว

5. การเตรียมผู้ป่วย

ไม่ต้องมีการงดน้ำงดอาหาร

6. ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง

EDTA Blood collection tube

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี

7.1 Centrifuge for DG Gel cards (Diana Fuge)
7.2 DG Gel Sol.
7.3 น้ำยา Anti-D ชนิด IgM/IgG human monoclonal reagent
7.4 3% Rh(D) negative Control Cells (เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)
7.5 น้ำเกลือปกติ (0.9% NSS.)
7.6 Serofuge centrifuge
7.7 Automatic pipettes ขนาด 10 uL, 25 uL, 50 uL and 200 uL พร้อม Disposable tips
7.8 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 3% NSS โดยให้ทำปฏิกิริยากับ 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 หยด ลงในหลอดที่เป็น Positive control และ 3% B-cells 1 หยด ลงในหลอดที่เป็น 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 การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงในขั้นตอนของ Antiglobulin test

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

b. เติม 3% 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 ปั่นที่เหมาะสมเพื่อการอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

9.2.3.2 บันทึกผลลงในตาราง ถ้าให้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ลงผล Y(yes) แต่ถ้าไม่ได้ผลตรงตามข้อกำหนดให้ใส่ N (no)

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

9.2.3.3 การหาเวลาปั่นที่เหมาะสมเพื่อการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขั้นตอนของ Antiglobulin test

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

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

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการปั่นอ่านปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง คือระยะเวลาน้อยที่สุดที่ให้ผลครบตามข้อกำหนดทุกข้อ (ตอบ yes ครบทุกข้อ)

10. ขั้นตอนของกระบวนการ

10.1 การตรวจหาหมู่โลหิต Rh ด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

10.1.1 เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 1 หลอด เขียน “D”

10.1.2 หยด Anti–D ลงในหลอด “D” 2 หยด

10.1.3 เติม 3% cells suspension ของผู้ป่วยที่จะทดสอบใน 0.9% NSS 1 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

10.1.4 ปั่นอ่านผล ด้วย Serofuge centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ได้ calibrate ไว้

11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ

ทำการควบคุมคุณภาพภายใน เดือนละ 1 ครั้ง หรือในวันที่มีการขอใช้โลหิตครั้งแรกของเดือนนั้นโดยทำเหมือนกับการตรวจตัวอย่างผู้ป่วย วัสดุและน้ำยาที่ใช้ประกอบด้วยดังนี้

a. น้ำยา Anti-D ชนิด IgM/IgG human monoclonal reagent
b. น้ำเกลือปกติ (3% NSS.)
c. Glass test tube ขนาด 10 x 75 มม.
d. DG Gel solution

11.1 การควบคุมคุณภาพภายในการตรวจหาหมู่โลหิต Rh ด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

11.1.1 เตรียมหลอดทดลองขนาด 12 x 75 mm. จำนวน 2 หลอด เขียน “D+” และ “D-” อย่างละ 1 หลอด

11.1.2 หยด Anti–D ลงในทั้ง 2 หลอด หลอดละ 2 หยด

11.1.3 เติม 3% Standard O_1-cell 1 หยด ในหลอด“D+” (เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย) ซึ่งมี D antigen จึงใช้เป็น Positive Control แล้วเขย่าให้เข้ากัน

11.1.4 เติม 3% Rh Negative Control (เตรียมโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ) 1 หยด ในหลอด “D-” จึงใช้เป็น Negative Control แล้วเขย่าให้เข้ากัน

11.1.5 ปั่นอ่านผล ด้วย Serofuge centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาที่ได้ calibrate ไว้ เอียงหลอดเขย่าเบาๆให้หลุดจากก้นหลอด เพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า

หลอด“D+” ผลบวก (Positive) คือ มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

หลอด“D-” ผลลบ (Negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (เมื่อทำจนครบทุกขั้นตอน)

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

13. สิ่งรบกวน

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

13.2 ต้องระวังในกรณีที่ใช้น้ำยา monoclonal anti-D ที่มีความแรงมาก ซึ่งสามารถตรวจ weak D ได้ตั้งแต่เมื่อปั่นอ่านผลทันทีที่อุณหภูมิห้อง (ดูจากเอกสารกำกับน้ำยา) ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจผู้บริจาคโลหิตเท่านั้น ไม่ควรใช้ตรวจผู้ป่วย เพราะอาจทำให้ผู้ป่วยที่เป็น weak D ซึ่งควรได้รับโลหิตชนิด Rh negative ถูกตรวจพบเป็น Rh(D) positive ได้

13.3 น้ำยามี contamination การเก็บที่ไม่เหมาะสม หรือหมดอายุทำให้ antibody reactivity ลดลง พวก chemically modified IgG antibody จะถูกทำลายโดย enzyme ของแบคทีเรีย

13.4 มีแอนติบอดีอื่นๆมา coat cells ซึ่งจะเกิดกรณีที่เม็ดเลือดแดงไม่มีปฏิกิริยาจับกลุ่มใน anti-D ทำ IAT ต่อได้ผล positive แต่เมื่อทำ DAT ก็ได้ผลบวกด้วย ทำให้สรุปไม่ได้ว่าเป็น Weak D จริงหรือไม่ หรือเป็น Rh negative ที่มี IgG antibody ของหมู่เลือดอื่นๆมา coat อยู่ อย่างไรก็ตาม ถ้าเป็นผู้ป่วยต้องได้รับเลือด Rh negative และควรทดสอบเพิ่มเติมโดย elute เอาแอนติบอดีที่ coat เซลล์ออกไปก่อน จึงนำเซลล์ไปทำ Rh(D) typing อีกครั้ง

14. หลักการของขั้นตอนการคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งที่เกี่ยวข้องอาทิความไม่แน่นอนของการวัด

ไม่มี

15. ช่วงอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก

ไม่มี

16. ช่วงที่รายงานผลการทดสอบได้

การอ่านผลหมู่โลหิตด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

เอียงหลอดเขย่าเบาๆให้หลุดจากก้นหลอด เพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยตาเปล่า

- ผลบวก (Positive) คือ มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
- ผลลบ (Negative) คือ ไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การให้เกรดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม

4 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียว น้ำใส

3 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนใหญ่หลายก้อน น้ำใส

2 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดกลางหลายก้อน น้ำใส

1 + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กมากหลายก้อน น้ำขุ่น

W + คือ เม็ดเลือดแดงจับกลุ่มเป็นก้อนขนาดเล็กมากหลายๆก้อน น้ำขุ่นและมีสีชมพู เห็นได้ชัดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

17. คำแนะนำสำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด

ไม่มี

18. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม

ไม่มี

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ

19.1การอ่านผลหมู่โลหิตด้วยวิธีหลอดทดลอง (Test tube method)

19.1.1 ถ้าอ่านความแรงของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่าในขั้นตอนอุณหภูมิห้องเกิด agglutination ในหลอดที่เติม anti-D มากกว่าหรือเท่ากับ 2+ ร่วมกับ ผลการตรวจ negative control ถูกต้อง สรุปได้ว่าเม็ดเลือดแดงเป็น Rh positive

19.1.2 ถ้าผลการทดสอบ cell grouping ในหลอดที่เติม anti-D ให้ผล positive แต่เกิด agglutination น้อยกว่า 2+ หรือผลการตรวจ Rh negative control ให้ผล positive (เกิด agglutination) จะยังสรุปผลหมู่โลหิตไม่ได้

19.1.3 ถ้าผลการทดสอบให้ผล negative ทั้งในตัวอย่างเม็ดเลือดแดงที่นำมาทดสอบและตัวอย่าง Rh negative control ต้องทดสอบหา weak D ต่อไป

19.1.4 ในขั้นตอนการตรวจหา D^U (test for weak D) ถ้าให้ผล positive (เกิด agglutination) ในขั้นตอนการปั่นอ่านผลที่ 37° C ให้สรุปได้เลยว่าเป็น Rh positive แต่ถ้ายังให้ผล negative หรือไม่ชัดเจน เมื่อนำไปทดสอบต่อในขั้นตอน Indirect antiglobulin test (IAT) ถ้ายังให้ผล negative ทั้งจากการอ่านผลด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์ แสดงว่าเป็น D negative หรือ Rh negative จริง แต่ถ้าให้ผล positive เฉพาะในขั้นตอน IAT แสดงว่าเป็น D^U antigen

Rh typing	ผลการทดสอบในขั้นตอนการทดสอบ Rh typing		
	Room temperature	37° C	IAT
Rh positive	agglutination 2+ ถึง 4+		
Rh positive	agglutination แต่น้อยกว่า 2+	+	
Rh negative	-	-	-
Weak D	-	+	+
Weak D	-	-	+

19.1.5 น้ำยา Anti-D ในปัจจุบัน ทางบริษัทผู้ผลิตมักรวม IgG anti-D กับ IgM anti-D เข้าด้วยกัน ทำให้สะดวกต่อการแปลผล เพราะ IgM anti-D จะทำให้เกิด direct agglutination ได้ทันทีที่อุณหภูมิห้อง ส่วน IgG anti-D จะช่วยในการตรวจ weak D antigen เมื่อทำ Indirect Antiglobulin Test (IAT)

19.1.6 สำหรับผู้ป่วยที่ต้องรับโลหิต เมื่ออ่านผลทันทีที่อุณหภูมิห้องแล้วได้ผล negative ไม่จำเป็นต้องตรวจหา weak D ต่อ ให้ถือว่าผู้ป่วยที่มี D^U antigen เป็น Rh negative และจะต้องได้รับเลือดที่เป็น Rh negative เท่านั้นจึงจะปลอดภัย เพราะถ้าได้รับโลหิตที่เป็น Rh positive อาจสร้าง anti-D ได้

19.1.7 สำหรับผู้บริจาคโลหิตหากให้ผลบวก (เกิด agglutination) เมื่อปั่นอ่านผลทันทีที่อุณหภูมิห้อง ให้ติดฉลากเป็นหมู่ Rh positive แต่ถ้าให้ผลเป็นลบ ต้องทดสอบ weak D

ต่อ ถ้าการทดสอบหา weak D ให้ผลบวกที่ขั้นตอน 37° C และ IAT หรือ IAT อย่างเดียว ให้แปลผลเป็น weak D แต่ให้ติดฉลากเป็นหมู่ Rh positive

19.1.8 ดังนั้นผู้บริจาคโลหิตที่มี D^U antigen จึงให้ถือว่าเป็น Rh positive

19.2 การแปลผลหมู่โลหิตด้วยวิธีเจล (Gel technique)

Microtube D	Microtube D^u	สรุปหมู่เลือด
0	0	Rh negative
+	0	Weak D
0	+	Weak D
+	+	Rh Positive

O : ผลลบ (Negative), + : ผลบวก (Positive)

ใน Microtube Ctl จะต้องให้ผลลบทุกครั้ง ถ้าให้ผลบวกแสดงว่ามี autoantibodies

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 ไม่ล้างเซลล์ก่อนทดสอบ ทำให้ autoagglutinaton และ abnormal protein ในซีรัมทำให้เซลล์จับกลุ่มกันเอง เกิดผลบวกปลอม

21. เอกสารอ้างอิง

21.1 มาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (EX-LAB-008)

21.2 คู่มือปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การบริการโลหิค ของสภาเทคนิคการพทย์ (EX-LAB-009)

21.3 เอกสาร CERTIFICATE ของน้ำยา Anti-D ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (PI-LAB-160)

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

22. ภาคผนวก : -

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-090 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจหมู่โลหิตระบบ Rh D Typing

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 เป็นทุก 6 เดือน - แก้ไข ข้อ 11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ ทำการควบคุมคุณภาพภายในเดือนละ 1 ครั้ง โดยเพิ่ม หรือในวันที่มีการขอใช้โลหิตครั้งแรกของวันนั้น - เพิ่มเอกสารอ้างอิง ข้อ 22. ประกอบด้วย เอกสารอ้างอิงมาตรฐานธนาคารเลือดและงานบริการโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย (EX-LAB-008) และคู่มือปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์การบริการโลหิค ของสภาเทคนิคการพทย์ (EX-LAB-009)	
1 ก.พ. 66	3	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข	ร.ต.ศาสตร์ศิลป์