

วิธีปฏิบัติ

Work Instruction

เรื่อง การทำ Antiglobulin Test วิธีตรง (Direct Antiglobulin test)
และวิธีอ้อม (Indirect Antiglobulin Test)



กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์

โรงพยาบาลลำพูน

รหัสเอกสาร WI-BB-005		ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4
ผู้จัดทำ (นางสาวณัฐภา นันทขว้าง) นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ	1 ก.พ.2564 วัน / เดือน / ปี
ผู้ทบทวน (นางสาวศิริพร นันตา) ผู้จัดการวิชาการ	1 ก.พ.2564 วัน / เดือน / ปี
ผู้อนุมัติ (นายครรชิต กิตติมา) ผู้จัดการคุณภาพ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์	1 ก.พ.2564 วัน / เดือน / ปี

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 2 ใน 8

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน/ แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
30 เม.ย. 2561	0	อนุมัติใช้
29 ต.ค. 2561	1	แก้ไขคำว่า เครื่อง Incubate เป็น DG THERM หน้า 4,6 เครื่องปั่นอ่าน เป็น DG SPIN หน้า 4, 5,6 ID-LISS/Coombs Card เป็น DG Gel Coombs Card หน้า 4,5,6,7 ID-Diluent 2 เป็น DG Sol หน้า 4, 5,6
1 ก.พ. 62	2	- ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ก.พ.63	3	- ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ก.พ.64	4	- แก้ไขผู้จัดทำ จาก นางสาวกณิศา คำธิตา เป็น นางสาวณัฐฐา นันทขว้าง - แก้ไขผู้ทบทวน จาก นางสาวกนกรวรรณ ใจพิงค์ เป็น นางสาวศิริพร นันตา - แก้ไขผู้อนุมัติ จาก นายบรรเลง ปัญจบุรี เป็น นายครรชิต กิติมา

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 3 ใน 8

การทำ antiglobulin test วิธีตรง (Direct Antiglobulin Test) และวิธีอ้อม (Indirect Antiglobulin Test)

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

Direct antiglobulin test: เพื่อทดสอบหาเม็ดเลือดแดงที่มีการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิด IgG ในลักษณะ Sensitized red cells

Indirect antiglobulin test: เพื่อทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง

2. คำย่อ

DAT = Direct antiglobulin test

IAT = Indirect antiglobulin test

AHG = Anti-human globulin

3. หลักการของวิธีการทดสอบ

การเกิด Antigen-Antibody Reaction โดยมี AHG ช่วยทำหน้าที่เชื่อมโยงแอนติบอดีที่จับบนผิวเม็ดเลือดแดงหลายเซลล์ ทำให้เกิดการสร้างร่างแหและเกาะกลุ่มให้เห็นได้ด้วยตาเปล่า

4. รายละเอียดที่ต้องตรวจสอบ

4.1. ค่าความเป็นเส้นตรง

-

4.2. ค่าความแม่นยำ

-

4.3. ค่าความถูกต้อง

4.3.1. ถูกคน

4.3.2. ถูกชนิด

4.3.3. ถูกเวลา

4.3.4. ถูกสถานที่

4.4. ค่าความไม่แน่นอน

-

4.5. ระยะเวลาของการวัด

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 4 ใน 8

-

4.6. ค่าจริงของการวัด

-

4.7. ความไว

-

4.8. ความจำเพาะ

-

5. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง

ใช้ clotted blood หรือ anticoagulated blood

6. ประเภทของภาชนะบรรจุและสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง

หลอดทดลองขนาด 12 X 75 มิลลิเมตร กรณีใช้ clotted blood หรือ K₃EDTA Tube

7. เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

7.1. Direct antiglobulin test

7.1.1. เครื่องปั่นอ่าน (DG SPIN)

7.1.2. DG Gel Coombs Card

7.1.3. DG Sol

7.1.4. Auto pipette ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 ไมโครลิตร และ 50 ไมโครลิตร

7.1.5. Yellow tips

7.1.6. หลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร

7.2. Indirect antiglobulin test

7.2.1. เครื่อง Incubate (DG THERM)

7.2.2. เครื่องปั่นอ่าน (DG SPIN)

7.2.3. DG Gel Coombs Card

7.2.4. DG Sol

7.2.5. Auto pipette ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 ไมโครลิตร และ 50 ไมโครลิตร

7.2.6. Yellow tips

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 5 ใน 8

7.2.7. หลอดทดลองขนาด 12x75 มิลลิเมตร

8. วิธีการสอบเทียบ (มีการทวนสอบการวัด)

-

9. ขั้นตอนการดำเนินการ

9.1. ตรวจสอบความถูกต้องของสิ่งส่งตรวจ

9.1.1. สิ่งส่งตรวจและการฉีกส่งแลปในโปรแกรม PMK ถูกต้อง ตรงกัน

9.2. Direct antiglobulin test (DAT)

ตัวอย่างที่ใช้ เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของผู้ป่วย

วิธีทำ

9.2.1. เตรียม 1% เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของผู้ป่วย ในน้ำยา DG Sol (เลือดผู้ป่วย 5 ไมโครลิตร + DG Sol 500 ไมโครลิตร)

9.2.2. เติม 1% เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของผู้ป่วย 50 ไมโครลิตร ลงใน Microtube ของ DG Gel Coombs Card

9.2.3. ปั่น DG Gel Coombs Card ใน DG SPIN ความเร็วรอบ 990 rpm. 9 นาที แล้วอ่านผล

9.3. สาเหตุและการแปลผล Direct antiglobulin test (DAT): positive เบื้องต้น

9.3.1. **Autoantibodies** ต่อแอนติเจนของเม็ดเลือดแดงตนเอง แบ่งตามอุณหภูมิของ antibody activity ได้ 2 ชนิด คือ warm antibody autoimmune hemolytic anemia และ cold antibody autoimmune hemolytic anemia

9.3.2. **Hemolytic transfusion reaction** ในกรณีได้รับ โลหิตผิดหมู่ เม็ดเลือดแดงที่ให้ผล DAT บวก เป็นเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาค ที่มี antibody ของผู้ป่วยจับอยู่ ดังนั้นเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยจะมีเม็ดเลือดแดง 2 กลุ่มคือ ของตัวเอง และของผู้บริจาคโลหิต (ซึ่งมีจำนวนน้อยกว่า) ส่งผลให้เกิด mixed-field phenomenon ได้

9.3.3. **Hemolytic disease of fetus and newborn** ซึ่งใน ABO-HDFN ที่แม่เป็นหมู่ O พบ DAT ของลูก ให้ผลบวกได้บ้าง แต่ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดของ HDFN ที่มีสาเหตุมาจากหมู่โลหิตระบบอื่น มีผล DAT เป็นบวก ตัวอย่างเช่น Rh(D)-HDFN

9.3.4. **Drug-induced immune-mediated hemolysis** เป็นภาวะที่พบไม่บ่อย แต่มีรายงานยาหลากหลาย ชนิดที่ทำให้เกิดภาวะนี้ ที่รู้จักกันดี ได้แก่ Methyl dopa Penicillin และ Quinidine เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 6 ใน 8

9.4. Indirect antiglobulin test (IAT)

ตัวอย่างที่ใช้ Serum หรือ Plasma ของผู้ป่วย

วิธีทำ

9.4.1. เตรียม 1% Screening cells ทั้ง SC O₁ และ O₂ โดยนำ O cells 1 ส่วนใส่หลอดแก้วขนาด 12*75 มิลลิเมตร ปั่นให้อัดแน่นแล้วเติมน้ำส่วนสี่ทั้ง และเติม DG Sol ปริมาตรเป็น 3 ส่วน เช่น O cells 1 มิลลิลิตร ทำเป็น 3 มิลลิลิตร เป็นต้น

9.4.2. เติม 1% Screening cells 50 ไมโครลิตรทั้ง SC O₁ และ O₂ ลงใน Microtube ของ DG Gel Coombs Card โดยให้ค้างอยู่บนกระเปาะ (Reaction Chamber) ห้ามให้ไหลไปสัมผัส AHG ใน Microtube

9.4.3. เติม Serum หรือ Plasma ของผู้ป่วย 25 ไมโครลิตร

9.4.4. เคา DG Gel Coombs Card เบบๆแล้ว Incubate ใน DG THERM ที่อุณหภูมิ 37°C 15 นาที (สามารถ Incubate ได้ถึง 60 นาที โดยไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา)

9.4.5. ปั่น LISS Coombs Card ใน DG SPIN ความเร็วรอบ 990 rpm. 9 นาที แล้วอ่านผล

9.5. การอ่านผล

ผลบวก	มีเม็ดโลหิตค้างอยู่บน/ในเนื้อเจล
ผลลบ	โลหิตทั้งหมดตกอยู่ที่ก้น Microtube



เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 7 ใน 8

10. วิธีการควบคุมคุณภาพ

10.1. การควบคุมคุณภาพภายใน

10.1.1. ทดสอบ DG Gel Coombs Card โดยการทำให้ Daily Testing Reagent Red Cells and Antisera (FR-LAB-180)

10.1.2. ตรวจสอบ AHG ใน DG Gel Coombs Card ต้องไม่แห้งและอยู่บนเนื้อเจลอย่างสมบูรณ์ โดยต้องปั่นก่อนการใช้งาน

10.2. การควบคุมคุณภาพภายนอก

ร่วมกับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 3 ครั้ง

11. สิ่งรบกวน

11.1. สิ่งส่งตรวจ Hemolysis

12. หลักการของวิธีการคำนวณ ผลรวมทั้งความไม่แน่นอนของการวัด

-

13. ขอบเขตค่าอ้างอิงในคน

-

14. ขอบเขตค่าของผู้ป่วยที่รายงาน

ตรวจสอบผลการทดสอบก่อนการรายงานผล

15. การเตือนให้ระวัง

15.1. อัตราส่วนระหว่างเซลล์กับซีรัม ต้องตรงกับวิธีการทดสอบ ในกรณีการตรวจ IAT

15.2. ผู้ที่ทำการทดสอบ ต้องมีความตระหนัก รอบคอบ และมีสมาธิในการทำงาน

16. การแปลผล

-

17. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

17.1. เป็นน้ำยาที่ใช้เฉพาะห้องปฏิบัติการคนเท่านั้น

17.2. ปฏิบัติตามหลักสากลในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BB-005
	วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	
	เรื่อง การทำ Antiglobulin test วิธีตรง (DAT) และวิธีอ้อม (IAT)	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 4	หน้า 8 ใน 8

18. สิ่งนี้อาจเป็นสาเหตุของความแปรปรวน

-

19. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 19.1. เวชศาสตร์การธนาคารโลหิต คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล
- 19.2. คู่มือปฏิบัติการธนาคารเลือด คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 19.3. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต ปีที่ 21 ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม 2554

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต