4. การทดสอบโลหิตบริจาค
(Allogeneic Donated Blood Testing)

ประเทศไทยมีระบบการตรวจคัดกรองโลหิตแบบรวมศูนย์ (centralized donor blood screening) ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก โดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติและภาคบริการโลหิตแห่งชาติจำนวน 12 แห่ง เป็นศูนย์กลางตรวจคัดกรองโลหิตบริจาคทั่วประเทศ เพื่อให้มั่นใจว่าโลหิตมีคุณภาพและมีความปลอดภัย เพื่อเป็นมาตรฐานเดียวกันและใช้ทรัพยากรร่วมกันอย่างคุ้มค่าตามหลักเศรษฐศาสตร์ของการลงทุน อีกทั้งเป็นการยกระดับมาตรฐานระบบการตรวจคัดกรองโลหิตของประเทศไทยตามมาตรฐานสากล

มาตรฐานการตรวจโลหิตบริจาค ประกอบด้วย การตรวจหมู่โลหิตและตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงเพื่อป้องกันปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการรับโลหิต รวมถึงการตรวจคัดกรองการติดเชื้อเพื่อป้องกันการถ่ายทอดเชื้อทางโลหิตไปยังผู้ป่วย

กระบวนการทางห้องปฏิบัติการ การทดสอบโลหิตบริจาคประกอบด้วย

1. Pre-analytical phase คือ กระบวนการก่อนการตรวจวิเคราะห์ จะต้องตรวจสอบตัวอย่างที่ใช้ทดสอบก่อนการวิเคราะห์ ดังนี้
   ตรวจสอบความถูกต้องและครบถ้วนของสิ่งส่งตรวจและเอกสารที่ส่งมาพร้อมกันได้แก่ ชนิดของหลอด ปริมาตรของตัวอย่างโลหิตฉลาก สายปล้องถุงบรรจุโลหิต และอุณหภูมิระหว่างการขนส่ง
2. Analytical phase คือการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ให้ปฏิบัติตามแผนปฏิบัติการด้านการบริการโลหิตแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2565 - 2570 (หน้าที่ 17 - 20) ซึ่งเป็นข้อตกลงร่วมกันระหว่างกระทรวงสาธารณสุขและศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ให้ทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับงานบริการโลหิตปฏิบัติตามนโยบายดังกล่าว
3. Post-analytical phase คือ กระบวนการหลังการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทดสอบ ได้แก่ การตรวจสอบความถูกต้องของผลการทดสอบ วิธีการรายงานผลการทดสอบ การให้คำปรึกษาเกี่ยวกับผลการทดสอบ

เพื่อให้มั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของโลหิตต่อผู้ป่วย จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการดังนี้

4.1 การตรวจหมู่โลหิตระบบ ABO, RhD และตรวจคัดกรองแอนติบอดีต่อหมู่โลหิตบนเม็ดเลือดแดง (ABO Grouping, RhD typing and red cell antibody screening)

4.1.1 การตรวจหมู่โลหิตระบบ ABO

ตรวจแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงโดยตรวจเม็ดเลือดแดงกับน้ำยา monoclonal anti-A และ anti-B ร่วมกับตรวจ anti-A และ anti-B ในพลาสมา โดยตรวจพลาสมากับเซลล์มาตรฐานคือ เซลล์ A, เซลล์ B และเซลล์ O หากผลการตรวจของเม็ดเลือดแดงและพลาสมาได้ผลไม่สอดคล้องกัน ต้องหาสาเหตุและแก้ไขปัญหา เพื่อให้สรุปหมู่โลหิตได้ก่อนจ่ายโลหิตออกไป

ในกรณีที่เป็นการบริจาคครั้งแรก ต้องตรวจหมู่โลหิต ABO สองครั้ง ซึ่งสามารถตรวจได้ 2 แบบ ได้แก่ แบบที่ 1 การเจาะตรวจจากปลายนิ้วของผู้บริจาคโลหิตและตรวจจากหลอดตัวอย่างโลหิต หรือ แบบที่ 2 เป็นการตรวจจากหลอดตัวอย่างโลหิตและตรวจจากสายปล้องถุงบรรจุโลหิต ทั้งนี้สามารถใช้ซีรัมแทนพลาสมาได้ สำหรับการบริจาคโลหิตครั้งต่อไป สามารถตรวจครั้งเดียวโดยให้นำผลการตรวจโลหิตครั้งปัจจุบันไปตรวจสอบกับหมู่โลหิต ABO ในฐานข้อมูลเดิม ซึ่งผลการตรวจที่ได้ต้องตรงกัน หากไม่สอดคล้องกันต้องหาสาเหตุและแก้ไขปัญหา เพื่อให้ได้หมู่โลหิตที่ถูกต้องก่อนจ่ายโลหิตออกไป

ข้อควรระวัง

- เก็บน้ำยา antiserum ไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส
  ในระหว่างไม่ได้ใช้งาน ไม่ควรวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะจะทำให้น้ำยาเสื่อมสภาพได้
- ห้ามเจือจางน้ำยา antiserum ในการใช้ตรวจหมู่โลหิต เพราะจะทำให้เกิดผลลบปลอมได้
- ให้ปฏิบัติตามข้อกำหนดของผู้ผลิตน้ำยาอย่างเคร่งครัด
- กรณีได้ผล cell grouping และ serum grouping ไม่สอดคล้องกันทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ ให้ดำเนินการวิเคราะห์ต่อ ได้แก่ Adsorption/Elution test หรือตรวจ ABH substance ในน้ำลาย เป็นต้น ทั้งนี้สามารถส่งตัวอย่างโลหิตมาตรวจที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ หรือภาคบริการโลหิตแห่งชาติได้
- ปฏิกิริยาของการตรวจหมู่โลหิต โดยวิธี CTT สำหรับ cell grouping ควรมีความแรงของปฏิกิริยา agglutination เท่ากับหรือมากกว่า 3+ ส่วน serum grouping ควรมีความแรงของปฏิกิริยา agglutination เท่ากับหรือมากกว่า 2+ สำหรับปฏิกิริยาที่อ่อนกว่านี้ ก่อนจะสรุปผลต้องทดสอบเพิ่มเติม จึงจะสามารถสรุปผลได้

4.1.2 การตรวจหมู่โลหิตระบบ RhD

ในงานประจำวันจะตรวจเฉพาะแอนติเจน D เท่านั้น โดยตรวจเม็ดเลือดแดงกับ anti-D และอ่านผลดังนี้

คุณลักษณะของน้ำยา anti-D

การตรวจกรองหมู่โลหิต RhD ในผู้บริจาคโลหิต ต้องใช้น้ำยา anti-D ซึ่งผลิตจาก **หลาย clone** ผสมกันหรือแยกจากกันซึ่งสามารถตรวจพบ partial D category ได้แก่ DIV, DV และ DVI ได้ ซึ่งน้ำยา anti-D (IgM/IgG) ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ มีคุณสมบัติดังกล่าว สามารถใช้ตรวจได้ทั้งผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย โดยปฏิบัติตามเอกสารกำกับน้ำยา

การแปลผลสำหรับการตรวจหมู่โลหิต RhD ในโลหิตบริจาค

การแปลผลการทดสอบ เมื่อปั่นอ่านหลอดทดสอบหลังจากผสม cell และ antiserum ที่อุณหภูมิห้อง มีดังนี้

- การตรวจกรองหมู่โลหิต RhD

  หากให้ผลบวกความแรงปฏิกิริยา 3+ ถึง 4+ ให้สรุปผลเป็น **RhD บวก** ไม่ต้องทำการทดสอบด้วยน้ำยา anti-D ชนิดที่สองต่อ ให้ติดฉลากชี้บ่งเป็น “Rh+”

- การตรวจยืนยันหมู่โลหิต RhD

  หากการตรวจกรองหมู่โลหิต RhD ให้**ผลบวก**ความแรงปฏิกิริยาเท่ากับหรือน้อยกว่า 2+ ต้องดำเนินการทดสอบ weak D test ต่อ โดยเลือกใช้น้ำยา anti-D อีก 1 ชนิดที่ต่าง clone กัน โดย incubate ที่ 37 ℃ ตามเวลาที่กำหนดในเอกสารกำกับน้ำยา ถ้าได้ผลบวกที่ 37 ℃ phase และ/หรือ AHG phase ก่อนการสรุปผล ต้องทำการทดสอบ direct antiglobulin test (DAT) ของ cell นั้น ซึ่งต้องได้ผลเป็นลบจึงจะสรุปว่าเป็น weak D หรือ partial D ให้ติดฉลากชี้บ่งเป็น “Rh+”

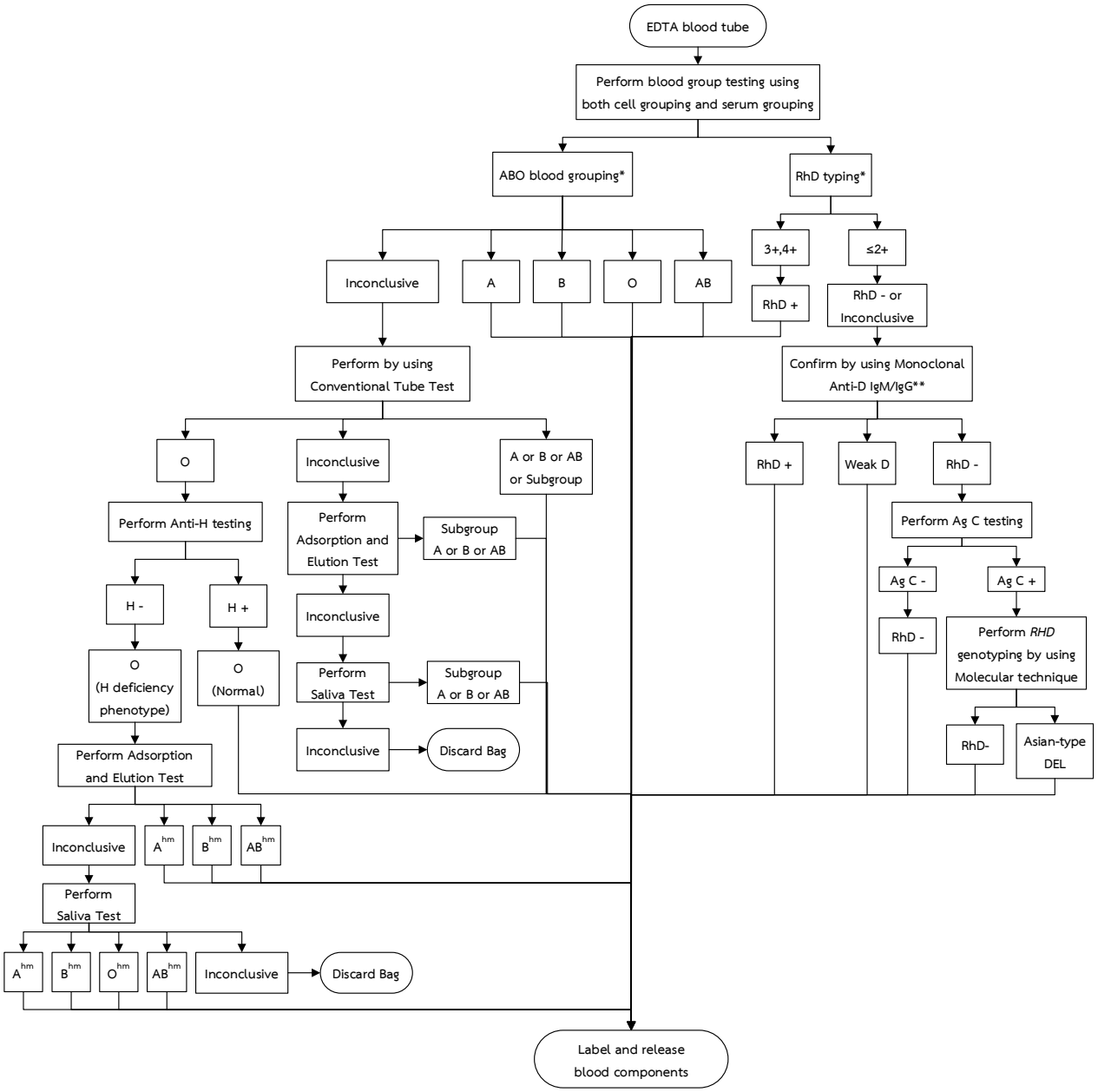
  ข้อควรระวัง ผู้ที่มี DAT บวก จะให้ผลบวกปลอม อาจทำให้แปลผล RhD ผิดในขั้นตอนนี้ หากต้องการทราบหมู่โลหิต RhD ที่แท้จริง ต้องตามผู้บริจาคโลหิตมาตรวจซ้ำเป็นระยะจนกว่า DAT เป็นลบ

  หากการตรวจกรองหมู่โลหิต RhD ให้**ผลลบ**ในขั้นตอนการปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้อง จะยังไม่สามารถสรุปว่าเป็น RhD ลบ ได้ ต้องทำการทดสอบ weak D test ต่อ ถ้าได้ผลเป็นลบทั้ง 37 ℃ phase และ AHG phase จึงสรุปว่าเป็น RhD ลบ ให้ติดฉลากชี้บ่งเป็น “Rh-”

- การตรวจ RhDel ชนิดอัลลีล Asian-type DEL ในผู้บริจาคโลหิต

  ปัจจุบัน ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้นำโลหิต RhD ลบที่ตรวจได้ด้วยวิธี serological test ดังกล่าว มาทดสอบต่อ เพื่อแยกระหว่าง RhDel ชนิดอัลลิล Asian-type DEL (*RHD*01EL.01*, *RHD*DEL1*, หรือ c.1227 G>A) กับ RhD ลบ (RhD negative) ซึ่งมีความสำคัญ คือ ให้นำโลหิตของผู้บริจาคโลหิตที่เป็น Asian-type DEL ไปให้กับผู้ป่วยที่เป็น RhD บวกหรือ Asian-type DEL เท่านั้น ลดความเสี่ยงที่ผู้ป่วยจะสร้าง anti-D จากการรับโลหิต RhDel นอกจากนี้ยังสามารถจัดหาโลหิตให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้โดยไม่ต้องรอโลหิต RhD ลบ ทำนองเดียวกัน สตรีตั้งครรภ์ที่เป็น Asian-type DEL ไม่จำเป็นต้องให้ RhIG เพื่อป้องกันการสร้าง anti-D

เมื่อตรวจ RhDel ชนิดอัลลิล Asian-type DEL ได้ผลลบ แสดงว่าเป็น RhD ลบ (RhD negative) จะติดฉลากชี้บ่งที่ยูนิตเป็น “Rh-” หากได้ผลบวก แสดงว่าเป็น RhDel (Asian-type DEL) จะติดฉลากชี้บ่งที่ยูนิตเป็น “Rh+(Del)” ซึ่งจะต้องเปลี่ยนบัตรประจำตัวผู้บริจาคโลหิตที่แสดงหมู่โลหิตให้สอดคล้องกับผลการตรวจ



ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหมู่โลหิตระบบ ABO และ RhD

*เป็นผลจากการตรวจคัดกรอง (initial testing) ซึ่งผลการตรวจ inconclusive อาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ

**เป็นผลจากการตรวจยืนยัน (confirmatory testing)

ขั้นตอนการตรวจ ABO grouping และ RhD typing

1. นำหลอดตัวอย่างโลหิตชนิด EDTA มาปั่นแยกส่วนเม็ดเลือดแดงและพลาสมา
2. นำหลอดตัวอย่างโลหิตชนิด EDTA ที่ปั่นเรียบร้อยแล้ว มาทำการทดสอบหมู่โลหิตทั้งระบบ ABO และ RhD โดยต้องทดสอบทั้ง cell grouping และ serum grouping แล้วนำผลการทดสอบมาสรุปร่วมกัน
3. กรณีที่ไม่สามารถสรุปผลหมู่โลหิต (inconclusive) ให้นำหลอดนั้นมาตรวจโดยวิธี conventional tube test (CTT) อีกครั้ง ถ้าได้ผลการตรวจเป็นหมู่โลหิต A หรือ B หรือ AB สามารถบันทึกข้อมูลเข้า LIS ได้เลย แต่ถ้าได้ผลเป็นหมู่โลหิต O ให้ทำการทดสอบต่อด้วย anti-H เพื่อดูว่าเป็น H deficient phenotype หรือเป็นหมู่ O ปกติลักษณะเฉพาะของ H deficient phenotype คือ ไม่มีแอนติเจน H, A หรือ B และมีแอนติบอดีชนิด IgM anti-H ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในพลาสมา ซึ่งผลการทดสอบต่อ anti-H จะให้ผลเป็นลบ

   ในกรณี classical O Bombay จะเป็นกลุ่ม non-secretor ไม่สามารถตรวจพบแอนติเจน H, A และ B บนเม็ดเลือดแดง และพบ anti-H ที่มีความแรง 4+ โดยมักพบผลการตรวจหมู่โลหิตระบบ Lewis เป็น Le (a+b-)

   กรณีที่ไม่สามารถสรุปหมู่โลหิตได้ (inconclusive) ให้จำหน่ายโลหิตทิ้ง และแนะนำผู้บริจาคโลหิตตรวจเพิ่มเติม เช่น การตรวจหมู่โลหิตในครอบครัวเพิ่มเติม (family study) เป็นต้น

   สำหรับการเกิด ABO discrepancies ต้องทดสอบต่อเพื่อทราบหมู่เลือดที่แท้จริงหลังจากนั้นจึงจะสามารถสรุปผลการทดสอบได้
4. กรณีผลการตรวจเป็น RhD ลบ
   - นำหลอดตัวอย่างนั้นไปทดสอบต่อด้วยน้ำยา monoclonal anti-D (IgM/IgG) ซึ่งมี clone แตกต่างกัน ด้วยวิธี CTT ซึ่งผลการทดสอบจะมี 3 รูปแบบ คือ RhD ลบ หรือ RhD บวก หรือ weak D สามารถบันทึกข้อมูลเข้าระบบฐานข้อมูลผู้บริจาคโลหิต (LIS) ได้เลย
   - กรณีได้ผลการตรวจเป็น RhD ลบ จะทำการทดสอบ C antigen ต่อในกรณีที่พบผลการตรวจ RhC phenotype เป็นบวก ให้นำไปทดสอบด้วยวิธี molecular testing ต่อเพื่อแยกระหว่าง RhD ลบ และ RhDel (Asian-type DEL)
5. ตรวจสอบข้อมูลแล้วติดฉลาก และจ่ายโลหิตต่อไป

4.1.3 โลหิตบริจาคที่พบว่ามีผล positive direct antiglobulin test (DAT บวก)

ในการตรวจ weak D ของโลหิตบางยูนิตอาจพบมีผล DAT บวก ให้จ่าย non-red cell components จากโลหิตยูนิตนี้ได้

ผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวก ถ้าพบผลบวกครั้งแรก ให้เว้นการบริจาคโลหิตเป็นระยะเวลา 1 ปี เมื่อครบ 1 ปี ให้ผู้บริจาคโลหิตมาตรวจซ้ำ หากได้ผล DAT บวก ให้งดบริจาคโลหิตถาวร ยกเว้น

เป็นหมู่โลหิตหายาก แต่ถ้าได้ผลลบ สามารถบริจาคโลหิตได้ ถ้าครบ 3 เดือนแล้วกลับมาพบผลบวกอีก ให้เว้น 1 ปี ซึ่งถ้ากลับมาบริจาคโลหิตแล้วพบผลบวก ให้งดบริจาคโลหิตถาวร แต่ถ้าได้ผลลบให้บริจาคโลหิตได้

กรณีที่เป็นโลหิตหายากสามารถบริจาคโลหิตได้ ถ้าจำเป็นต่อผู้ป่วย สำหรับผู้บริจาคโลหิตถ้าโรงพยาบาลตรวจพบว่าโลหิตยูนิตนั้นมีผล DAT บวกจากการนำไปทำ crossmatch แล้วมีปัญหาให้ใช้หลักเกณฑ์เดียวกันนี้ สำหรับการให้บริจาคโลหิตต่อ

4.2 ผลของหมู่โลหิตในอดีต

ต้องทดสอบหมู่โลหิต ABO และ RhD ในโลหิตบริจาคทุกครั้ง ไม่นำผลของหมู่โลหิต ABO และ RhD ที่เคยตรวจในอดีตมาติดฉลากบนถุงบรรจุโลหิตที่บริจาคครั้งปัจจุบันโดยไม่มีการตรวจซ้ำ แต่ให้เก็บประวัติหมู่โลหิตผู้บริจาคโลหิตไว้ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลครั้งปัจจุบัน ซึ่งต้องได้ผลตรงกัน ถ้าผลที่ได้แตกต่างกันต้องทดสอบหมู่โลหิต ABO และ RhD อีกครั้ง ด้วยตัวอย่างโลหิตจากหลอดตัวอย่างและสายถุงโลหิต ต้องหาสาเหตุและแก้ไขปัญหาให้ได้ก่อนจ่ายโลหิตออกไป

4.3 การทดสอบคัดกรองแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง (red cell antibody screening)

4.3.1 โลหิตบริจาคทุกยูนิตต้องทดสอบหาแอนติบอดีอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางคลินิก (unexpected antibody) นอกเหนือจาก anti-A และ anti-B โดยใช้ screening cellsจำนวน 2 ชนิด คือ O1 และ O2

4.3.2 วิธีการที่ใช้ทดสอบต้องเป็นวิธีมาตรฐานและใช้เซลล์มาตรฐาน (screening cells) ที่สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกได้ ซึ่งชุดเซลล์มาตรฐานมี 2 ชนิด ได้แก่ ชุดเซลล์มาตรฐาน O1 และ O2 screening cells สำหรับตรวจ antibody screening ในผู้บริจาคโลหิต และชุดเซลล์มาตรฐาน O1 O2 และ O3 screening cells สำหรับตรวจ antibody screening ในผู้ป่วย ซึ่งมีความแตกต่างในการเตรียมเซลล์ ดังนี้

- ชุดเซลล์มาตรฐาน O1 และ O2 screening cells

  แต่ละ O screening cells ได้จากการ pool เซลล์จากผู้บริจาคโลหิต 2 ราย ในอัตราส่วน 1:1

- ชุดเซลล์มาตรฐาน O1 O2 และ O3 screening cells

  แต่ละ O screening cells ได้จากผู้บริจาคโลหิต 1 ราย (individual cells) และเมื่อจัดชุดแล้วต้องเป็น antigenic complementary antigen profile ที่ประกอบด้วย antigen ที่มีความสำคัญทางคลินิกครบ

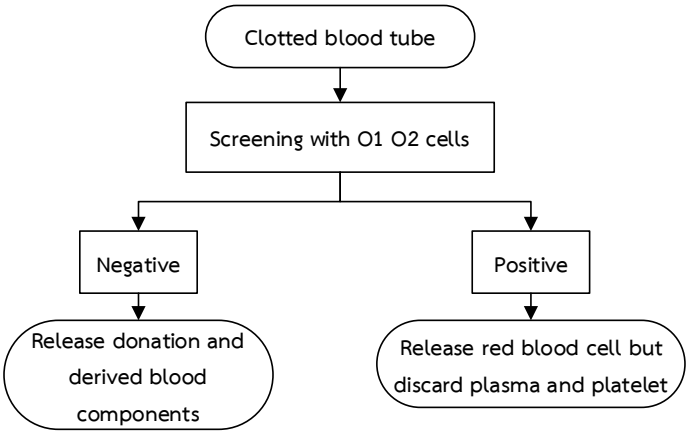
ในผู้บริจาคโลหิต ให้ใช้ O1 และ O2 screening cells เนื่องจากพบว่ามีแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย และส่วนใหญ่เป็น natural occurring antibodies ทำให้เกิดปฏิกิริยา hemolytic transfusion reactions น้อยมาก

ในผู้ป่วยให้ใช้ O1 O2 และ O3 screening cells เนื่องจากต้องใช้ screening cells มีความแรงของ antigen สูง เพื่อให้สามารถตรวจพบ antibodies ที่มีความแรงต่ำหรือที่เพิ่งเริ่มสร้างในผู้ป่วยให้ได้มากที่สุด เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาทั้ง acute/delayed hemolytic transfusion reactions

- การใช้ชุดเซลล์มาตรฐานที่แตกต่างกัน เนื่องจากชุดเซลล์มาตรฐาน O1 O2 และ O3 screening cells มีแอนติเจนบางชนิดมีความแรงของปฏิกิริยามากกว่าชุดเซลล์มาตรฐาน O1 และ O2 screening cells โดยแอนติเจนที่มี dosage effect เช่น เซลล์ MM กับ MN ซึ่งความแรงของ M แอนติเจนในเซลล์ MM สูงกว่าเซลล์ MN และอีกตัวอย่าง คือ เซลล์ EE ซึ่งเป็น homozygous มี E แอนติเจนสูงกว่าเซลล์ Ee ทำให้ชุดเซลล์มาตรฐาน O1 O2 และ O3 screening cells สามารถตรวจพบ anti-E ได้ดีกว่าการตรวจด้วยชุดเซลล์มาตรฐาน O1 และ O2 screening cells ซึ่งชุดเซลล์มาตรฐาน O1 และ O2 มีบางเซลล์ไม่ใช่ homozygous จึงมีความสามารถในการ detect antibody ได้น้อยกว่า เป็นต้น จึงทำให้ความสามารถในการตรวจหา unexpected antibody ที่สำคัญของชุดเซลล์มาตรฐานทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน

4.3.3 กรณีที่พบผลการทดสอบเป็นบวกทั้ง O1 และ O2 screening cells และเป็นหมู่โลหิต O ให้ทำการทดสอบต่อด้วย anti-H เพื่อดูว่าเป็น H deficient phenotype หรือไม่

4.3.4 ถ้าตรวจพบ unexpected antibody ให้ใช้เฉพาะ red blood cells และจำหน่ายทิ้งส่วนประกอบโลหิตที่เป็น plasma ได้แก่ FFP และ platelets เป็นต้น



ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจ red cell antibody screening

4.4 การตรวจคัดกรองการติดเชื้อที่ถ่ายทอดทางโลหิต (transfusion-transmitted infection screening, TTI screening)

โลหิตบริจาคทุกยูนิตจะต้องได้รับการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการตามแผนปฏิบัติการด้านการบริการโลหิตแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2565 - 2570 ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ซึ่งแบ่งการตรวจออกเป็น 2 วิธี คือ วิธีทางซีโรโลยี (serological method) และวิธีทางอณูชีววิทยาแบบตัวอย่างเดี่ยว (individual donation nucleic acid testing, ID-NAT) ดังนี้

- Human immunodeficiency virus (HIV) ทั้ง HIV-1 และ HIV-2
- Hepatitis B virus (HBV)
- Hepatitis C virus (HCV)
- *Treponema pallidum* ที่ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส (syphilis)

สำหรับการตรวจคัดกรองการติดเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อมาลาเรีย, Chagas disease, เชื้อ HTLV-1/2 เป็นต้น ควรพิจารณาตามหลักฐานทางระบาดวิทยาในพื้นที่นั้นๆ

สำหรับน้ำยาและเครื่องมือที่ใช้จะต้องระบุว่าสามารถใช้ในการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาคได้ และเป็นเทคโนโลยีมาตรฐานสากล รวมทั้งผลิตภัณฑ์และเครื่องมือที่ใช้ในระบบการตรวจจะต้องได้รับการรับรองมาตรฐานสากล และจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) นอกจากนี้ก่อนนำมาใช้ตรวจต้องมีระบบการประเมิน คัดเลือก และตรวจสอบความถูกต้อง โดยชุดตรวจเหล่านี้ต้องมีความไวและความจำเพาะไม่น้อยกว่า 99.5% เพื่อประกันความถูกต้องของผลการตรวจ

ในการตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยาแบบตัวอย่างเดี่ยว เป็นการตรวจที่ให้ความไวสูงสุด เนื่องจากไม่มีปัจจัยที่เกี่ยวกับการเจือจางตัวอย่างทดสอบ จึงให้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำกว่าวิธี pool ซึ่งไม่ว่าจะเป็น pool ขนาดใดย่อมมีปัจจัยการเจือจางของตัวอย่างมาเกี่ยวข้อง ทำให้ความไวในการตรวจลดลง หรือทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) โดยเฉพาะในผู้ที่เพิ่งรับเชื้อ หรือมีปริมาณเชื้อต่ำ ซึ่งสามารถถ่ายทอดเชื้อแก่ผู้ป่วยได้ (transfusion-transmitted infection)

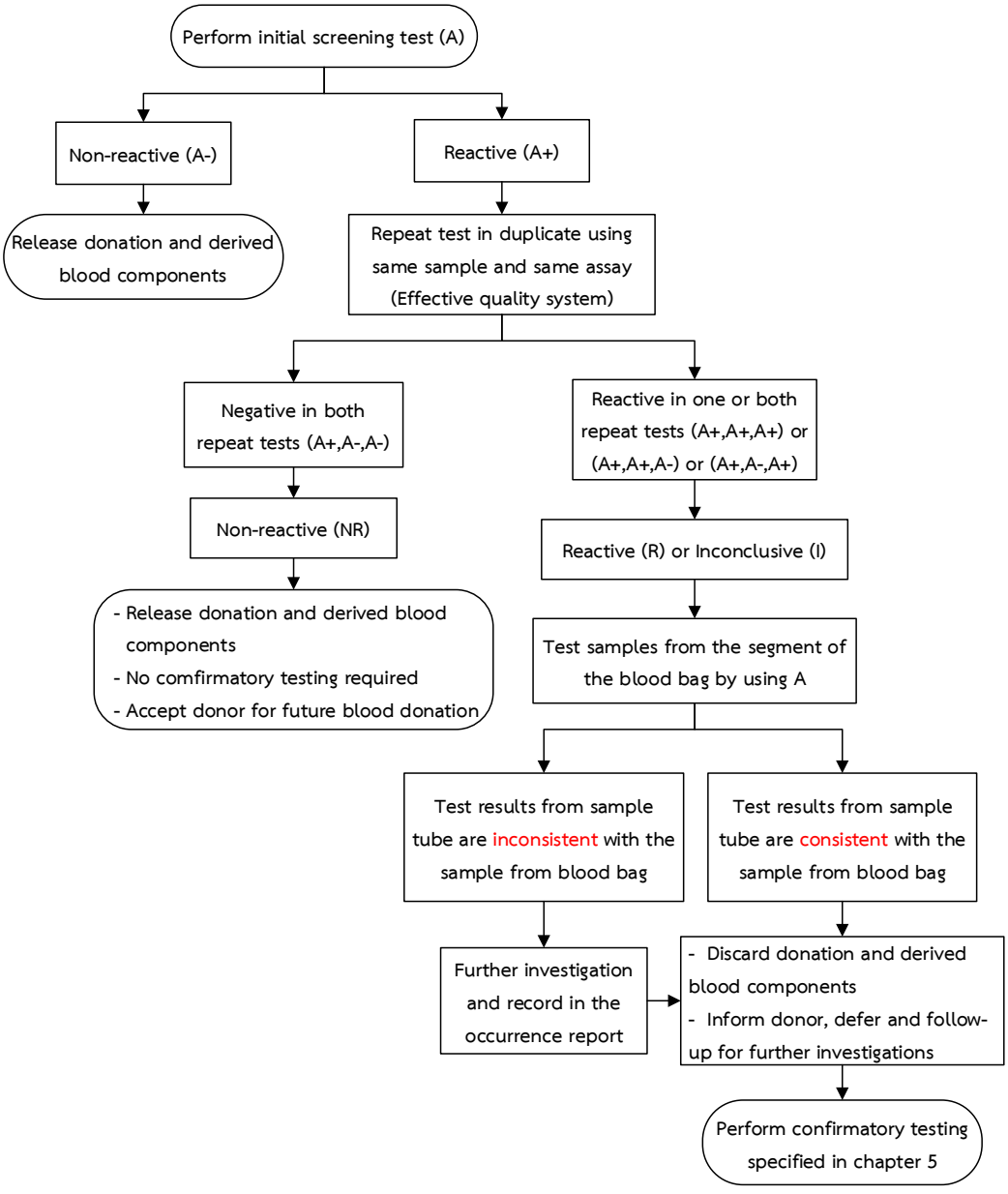
4.4.1 วิธีน้ำเหลืองวิทยา (serological method)

สำหรับการตรวจคัดกรอง HIV, HBV และ HCV ด้วยวิธี serology หากผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นเป็นบวก (initial reactive, IR) ต้องนำหลอดตัวอย่างโลหิตนั้นมาทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม หากอย่างน้อย 1 ใน 2 ที่ทดสอบซ้ำเป็นบวก จึงสรุปว่าเป็นผลบวก (reactive) จากนั้นนำตัวอย่างในสายปล้องของถุงโลหิตนั้นมาทดสอบโดยวิธีเดิม เพื่อพิสูจน์ว่าผลตรวจที่ได้เป็นของโลหิตถุงนั้นจริง ในกรณีที่ผลการตรวจจากหลอดและสายปล้อง bag ไม่ตรงกัน จะต้องหาสาเหตุก่อนการสรุปผล เนื่องจากอาจเกิดจากการสลับตัวอย่างเกิดขึ้น

4.4.1.1 ไวรัสก่อโรคเอดส์หรือเชื้อเอชไอวี ให้ตรวจด้วย HIV antigen antibody combination assay ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay (EIA) หรือ Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)

4.4.1.2 ไวรัสตับอักเสบบี ให้ตรวจ HBsAg ด้วยวิธี EIA หรือ CLIA

4.4.1.3 ไวรัสตับอักเสบซี ให้ตรวจ Anti-HCV ด้วยวิธี EIA หรือ CLIA



ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจ TTI serological method (modified from WHO guidance)

กระบวนการตรวจคัดกรองโลหิตโดยละเอียด

1. นำตัวอย่าง clotted blood ตรวจคัดกรองเบื้องต้น (initial screening test) ด้วยน้ำยาที่ 1 (A) ซึ่งผลการทดสอบเบื้องต้นแบ่งได้ 2 กรณี ได้แก่
    - กรณีที่ 1 ผลการตรวจเป็นลบ (Non-reactive, A-) ในกรณีนี้จะสามารถจ่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตให้แก่ผู้ป่วยได้ และผู้บริจาคโลหิตสามารถบริจาคโลหิตได้ตามปกติ
    - กรณีที่ 2 ผลการตรวจเป็นบวก (Reactive, A+) ต้องทำการตรวจซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate test) โดยใช้ตัวอย่างเดิมและวิธีการเดิม เพื่อความแม่นยำของการตรวจซ้ำ เมื่อทำการตรวจซ้ำแล้วจะได้ผลการตรวจ 2 กรณี ได้แก่
        - กรณีที่ 1: ผลตรวจซ้ำทั้งสองครั้งเป็นลบ (A+, A-, A-) ให้รายงานผลการตรวจเป็นลบ (Non-reactive, NR) ในกรณีนี้จะสามารถจ่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตให้แก่ผู้ป่วยได้ ไม่ต้องทำการตรวจยืนยันและผู้บริจาคโลหิตสามารถบริจาคโลหิตได้ตามปกติ
        - กรณีที่ 2: ผลการตรวจซ้ำมีอย่างน้อย 1 ครั้งให้ผลการตรวจเป็นบวก (A+, A+, A+), (A+, A+, A-), หรือ (A+, A-, A+) หมายความว่ายังคงพบปฏิกิริยา ดังนั้นให้แปลผลการตรวจเป็นบวก (Reactive, R) หรือในบางครั้งอาจพบผลการตรวจที่ไม่สามารถสรุปผลได้ (Inconclusive, I) ซึ่งต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติม
2. ในกรณีที่พบผลการตรวจเป็นบวก ต้องทำการตรวจตัวอย่างเพิ่มเติม โดยนำตัวอย่างจากสายปล้อง bag มาตรวจโดยใช้การทดสอบแบบเดิม (A) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสอดคล้องกับตัวอย่างจากหลอดที่ใช้ตรวจครั้งแรกได้ผลการตรวจ 2 กรณี ได้แก่:
    - กรณีที่ 1: ผลการตรวจจากหลอดตัวอย่างและผลการตรวจจากสายปล้อง bag สอดคล้องกัน (consistent) หมายความว่าไม่พบเหตุการณ์การสลับกันในขั้นตอนการเจาะเก็บโลหิต ให้จำหน่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตทิ้งทั้งหมด และติดตามผู้บริจาคโลหิตมาเจาะตรวจซ้ำเพื่อยืนยันผลการตรวจ
    - กรณีที่ 2: ผลการตรวจจากหลอดตัวอย่างและผลการตรวจจากสายปล้อง bag ไม่สอดคล้องกัน (inconsistent) ต้องทำการตรวจสอบเพิ่มเติม บันทึกเหตุการณ์ลงในแบบฟอร์มรายงานเหตุการณ์ผิดปกติ (occurrence Report) ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น พบเหตุการณ์การสลับกันในขั้นตอนการเจาะเก็บโลหิต หรือเกิดการ cross contamination ในกระบวนการเจาะเก็บตัวอย่างโลหิต เป็นต้น ให้จำหน่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตทิ้งทั้งหมด และติดตามผู้บริจาคโลหิตมาเจาะตรวจซ้ำเพื่อยืนยันผลการตรวจ

3. ทำการตรวจยืนยัน (Confirmatory Testing) ตามมาตรฐานที่กำหนดในบทที่ 5 การตรวจติดตามผลการทดสอบโรคติดเชื้อของผู้บริจาคโลหิตและการบริหารจัดการผลิตภัณฑ์โลหิตติดเชื้อ

4.4.1.4 ซิฟิลิส

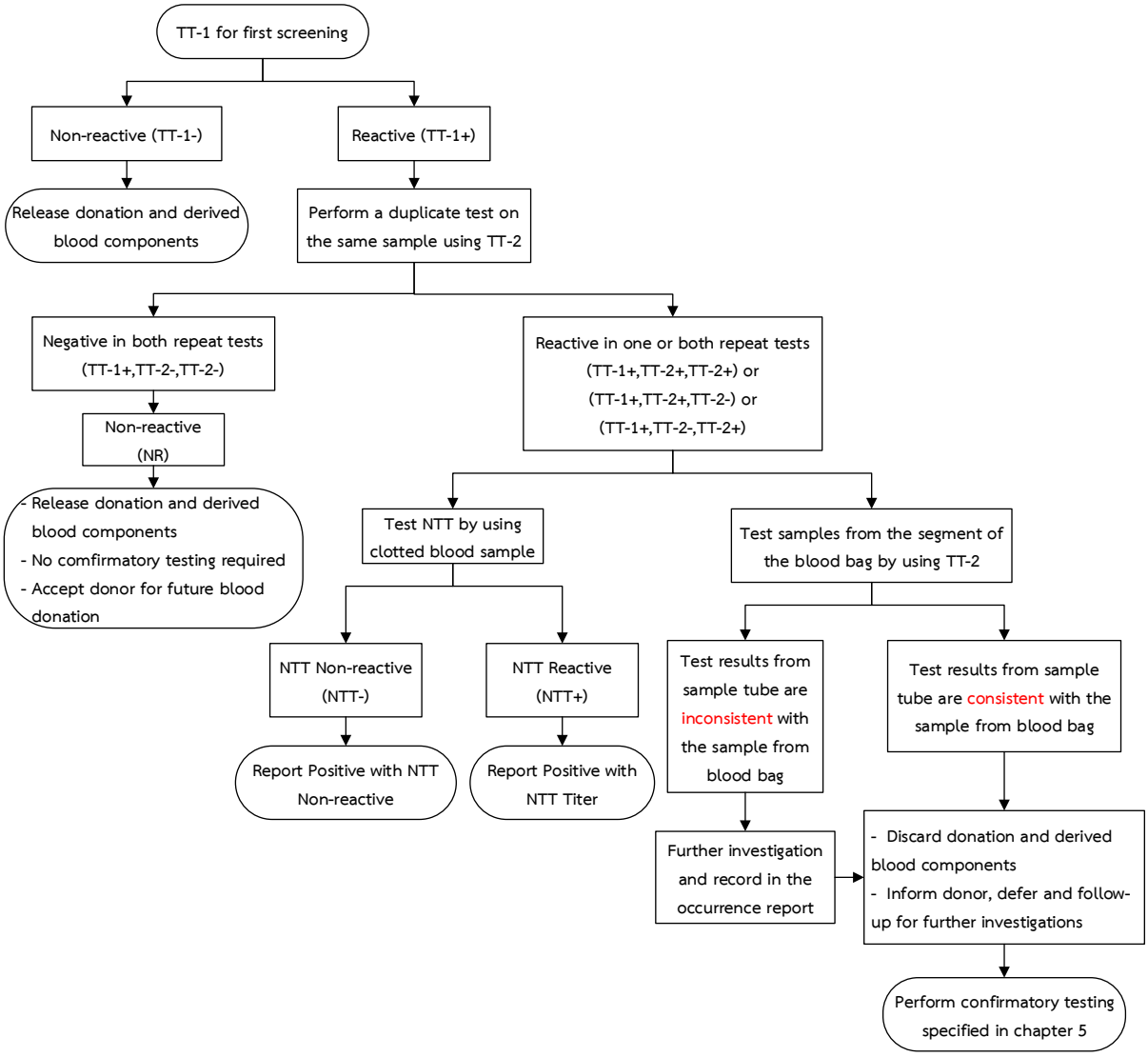
การทดสอบซิฟิลิสมีหลักการเลือกใช้วิธีทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะในระดับต่างๆ ดังนี้

การทดสอบกลุ่มที่1 (TT-1) เป็นกลุ่มการทดสอบที่มีความไวสูง ใช้สำหรับตรวจคัดกรอง (screening test) แอนติบอดีต่อเชื้อ *Treponemal pallidum* โดยใช้วิธี EIA หรือ CLIA

การทดสอบกลุ่มที่ 2 (TT-2) เป็นกลุ่มการทดสอบที่มีความจำเพาะสูง ใช้สำหรับตรวจคัดกรอง (screening test) แอนติบอดีต่อเชื้อ *Treponemal pallidum* ได้แก่ *Treponema Pallidum* Haemagglutination Assay (TPHA) หรือ Treponema Pallidum Particle Agglutination Assay (TPPA) หรือ alternative test ที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่า TPHA และ TPPA

การทดสอบกลุ่มที่ 3 (Non Treponema Test, NTT) ใช้ตรวจติดตามการรักษา ได้แก่ Venereal disease research laboratory test (VDRL) หรือ Rapid Plasma Reagin (RPR)

สำหรับการตรวจคัดกรองซิฟิลิส กรณีที่การทดสอบกลุ่มที่ 1 (TT-1) เป็นบวก ต้องใช้การทดสอบอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีหลักการการทดสอบที่ต่างกันและให้ผลบวกตรงกัน ถ้าผลการตรวจครั้งแรก (TT-1) เป็นลบ สามารถรายงานผลเป็น negative ได้เลยโดยไม่ต้องทดสอบซ้ำด้วยการทดสอบในกลุ่มที่ 2 (TT-2)

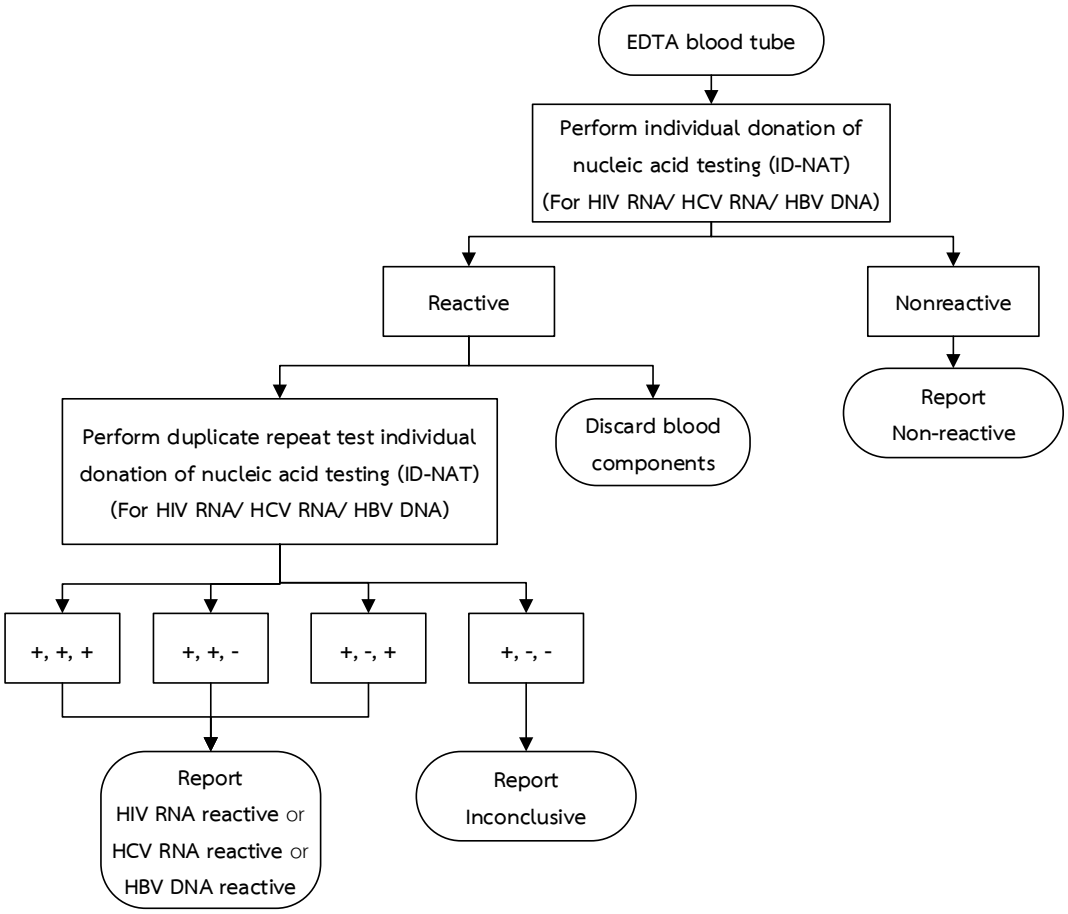


ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาการติดเชื้อ *Treponema Pallidum*

4.4.2 วิธีอณูชีววิทยาแบบตัวอย่างเดี่ยว (Individual donation nucleic acid testing; ID-NAT)

ID-NAT เป็นวิธีตรวจสำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA), ไวรัสตับอักเสบซี (HCV RNA) และเชื้อเอชไอวี (HIV RNA) และเชื้ออื่นๆ ตามประกาศเพิ่มเติม

การตรวจใช้หลักการ polymerase chain reaction (PCR) หรือ Transcription-mediated amplification (TMA) โดยตรวจด้วยเครื่องตรวจโลหิตอัตโนมัติ ซึ่งกรณีที่ตรวจพบผลการตรวจคัดกรองเบื้องต้นเป็นบวก (initial reactive, IR) ให้จำหน่ายโลหิตทิ้งและนำหลอดตัวอย่างนั้นมาทดสอบซ้ำ 2 ครั้งด้วยวิธีเดิม หลังจากนั้นหากผลการทดสอบเป็นบวกอย่างน้อย 1 ครั้ง ให้สรุปผลของตัวอย่างนั้นเป็นบวกจริง ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก หากผลการทดสอบเป็นลบทั้ง 2 ครั้ง ให้สรุปผลเป็น inconclusive เนื่องจากการตรวจ ID-NAT กรณีสารพันธุกรรมของเชื้อมีจำนวนน้อยอาจทำให้ผลการตรวจเป็นบวกหรือลบสลับกันได้ในตัวอย่างเดียวกัน



ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจ ID-NAT (modified from TTI serology, WHO guidance)

ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดต้องมีมาตรการที่ทำให้มั่นใจว่า

1. ไม่มีการสลับตัวอย่างโลหิต ต้องมีระบบป้องกันการเจาะเก็บตัวอย่างโลหิตสลับคน รวมทั้งมีระบบที่สามารถตรวจสอบได้ว่าผลที่ตรวจได้เป็นผลการตรวจของโลหิตยูนิตนั้นจริง โดยผลการตรวจตัวอย่างโลหิตจากหลอดตัวอย่างและสายถุงโลหิตต้องตรงกัน หากผลไม่ตรงกันและให้ผลบวกชัดเจน ให้สงสัยว่ามีการสลับตัวอย่างโลหิต ต้องนำพลาสมาจากสายถุงโลหิตทุกหมายเลขของหน่วยนั้นมาตรวจอีกครั้งเพื่อหาว่าถุงโลหิตใดที่มีผลเป็นบวกตรงกับหลอดตัวอย่าง
2. ต้องจัดให้มีการทดสอบ IQC โดยใช้ IQC material (kit control) ของผู้ผลิตและ IQC material จากแหล่งอื่นอีกแห่งหนึ่งที่ไม่ใช่ผู้ผลิตน้ำยาทดสอบที่ใช้อยู่ และมีการเข้าร่วมโปรแกรม EQA ขององค์กรที่มีมาตรฐานระดับชาติหรือนานาชาติ
3. โลหิตและส่วนประกอบโลหิตที่ยังไม่ได้ตรวจการติดเชื้อ หรือตรวจแล้วแต่มีผลบวก ต้องได้รับการแยกออกเป็นสัดส่วนและกักกันเพื่อให้มั่นใจว่าโลหิตและส่วนประกอบ

โลหิตดังกล่าว ไม่ถูกนำไปให้ผู้ป่วยโดยเด็ดขาด รวมทั้งมีกระบวนการเรียกคืนผลิตภัณฑ์และการตรวจสอบข้อมูลการบริจาคโลหิตย้อนหลัง (look-back)

4. มีการตรวจยืนยันการบริจาคที่ให้ผลเป็นบวก และต้องแจ้งให้ผู้บริจาคทราบ พร้อมกับการให้คำปรึกษา เพื่อให้ได้รับการรักษาและป้องกันการแพร่เชื้อ รวมทั้งให้งดบริจาคโลหิตอย่างถาวร
5. ชุดน้ำยาทดสอบทั้งหมด ควรได้รับการจัดเก็บและขนส่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและควบคุมได้ มีการทดสอบ lot-to-lot verification ก่อนการใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

1. Asia Pacific Blood Network (APBN), 2023
2. Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections: Recommendations. Geneva: World Health Organization; 2009.
3. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ, สภากาชาดไทย. แผนปฏิบัติการด้านการบริการโลหิตแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2565-2570. กรุงเทพฯ: สภากาชาดไทย; 2565.