วิธีปฏิบัติ

Work Instruction

เรื่อง การเตรียมเสมียร์เลือด การย้อมสี การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว การรายงานเม็ดเลือดแดง และการรายงานเกร็ดเลือด

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์

โรงพยาบาลลำพูน

รหัสเอกสาร WI – HEM - 003		ทบทวน / แก้ไขครั้งที่ 14
ผู้จัดทำ	..... (น.ส.พิสุทธินี กันธารักษ์) นักเทคนิคการแพทย์	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี
ผู้ทบทวน	..... (น.ส.ศิริพร นันตา) ผู้จัดการวิชาการ	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี
ผู้อนุมัติ	..... (นายครรชิต กิติมา) ผู้จัดการคุณภาพ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน / แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
8 ก.ค.2547	0	อนุมัติใช้
21 ก.ย.2549	1	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
2 ก.ค.2550	2	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 เม.ย.2551	3	-เปลี่ยนแปลงผู้ทบทวนวิธีปฏิบัติจาก “หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก” เป็น “ผู้จัดการวิชาการ” -เปลี่ยนแปลงผู้อนุมัติวิธีปฏิบัติจาก “หัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก” เป็น “ผู้จัดการคุณภาพ”
		รวมและเปลี่ยนแปลงรหัสของวิธีปฏิบัติเรื่องการเตรียมเสมียร์เลือดและการย้อม (WI-LAB-041) และเรื่อง การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวและรายงานเม็ดเลือดแดงจากเสมียร์เลือด (WI-LAB-042) เป็นวิธีปฏิบัติเรื่องการเตรียมเสมียร์เลือด การย้อม การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวและการรายงานความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง (WI-HEM-003)
1 ต.ค.54	4	แก้ไขวิธีปฏิบัติให้เป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189
		แก้ไขรายชื่อผู้จัดทำจาก นางนิลุบล ชาลีพจน์ ตำแหน่งเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญงาน เป็นนางสาวเกสรา ภูมาศ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์
1 ต.ค.55	5	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค.56	6	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.57	7	แก้ไขผู้จัดทำเอกสารเป็น นางสาวพิสุทธินี กันธารักษ์ แก้ชื่อกลุ่มงานเป็นกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์
12 ม.ค.58	8	แก้ไข หน้าที่ 6 เพิ่ม ระยะเวลาในการ Fix และย้อมสีนี้ สามารถปรับขึ้นลงได้โดยให้การติดสีของเสมียร์ออกมาคุณภาพดีที่สุดตามเกณฑ์
17 ส.ค. 59	9	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค. 60	10	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน / แก้ไข ครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
1 ต.ค. 61	11	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค. 62	12	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 พ.ย. 63	13	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ก.พ. 64	14	แก้ไขชื่อผู้ทบทวนเป็น น.ส.ศิริพร นันตา แก้ไขชื่อผู้อนุมัติเป็น นายครรชิต กิติมา

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

การเตรียมเสมียร์เลือดและการย้อมสี

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเตรียมเสมียร์เลือด การย้อมสี Wright- Giemsa stain การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว การรายงานเม็ดเลือดแดง และการรายงานเกร็ดเลือด

2. คำย่อและคำนิยาม

-

3. หลักการของวิธีการทดสอบ

เป็นการย้อมเซลล์ด้วยสีสองชนิดนั่นคือ Basic dye และ Acid dye สีที่ใช้เป็น Basic dye ได้แก่ Methylene blue และหรือ Oxidative product ของ Methylene blue Azure ซึ่งจะย้อมติดส่วนที่เป็น Acid ภายในเซลล์เช่น DNA ใน Nucleus , Granule ของ Basophil เป็นต้น ส่วน Acid dye ได้แก่ Eosin ซึ่งจะย้อมติดส่วนที่เป็น Base ภายในเซลล์ เช่น Hemoglobin และ Granule ของ Eosinophil

4. รายละเอียดที่ต้องตรวจสอบ

4.1. ค่าความเป็นเส้นตรง

-

4.2. ค่าความแม่นยำ

-

4.3. ค่าความถูกต้อง

-

4.4. ค่าความไม่แน่นอน

-

4.5. ระยะของการวัด

-

4.6. ค่าจริงของการวัด

-

4.7. ความไว

4.8. ความจำเพาะ

-

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

5. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง

ใช้เลือดจากเส้นเลือด 1- 3 ml. ใส่ในหลอดแก้วที่มีสารกันเลือดแข็ง K_3EDTA อยู่ ผสมเลือดและสารกันเลือดแข็งให้เข้ากันโดยการกลับหลอดแก้วขึ้น-ลงประมาณ 10 ครั้ง เพื่อไม่ให้เลือดแข็งตัว

6. ประเภทของภาชนะบรรจุและสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง

K_3EDTA Tube ขนาด 0.5 ml. หรือ 2.5 ml. ขึ้นกับปริมาณเลือดที่เจาะได้

7. เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

7.1. กล้องจุลทรรศน์

7.2. Capillary tube

7.3. Spreader

7.4. Slide ฝ้า

7.5. ถาดย้อมสี

7.6. สีย้อม Wright-Giemsa Stain

7.7. Buffer solution (Ph 6.4-6.8)

7.8. ที่เป่าผม

7.9. Immersion oil

8. วิธีการสอบเทียบ (มีการทวนสอบการวัด)

-

9. ขั้นตอนการดำเนินการ

9.1. การเตรียมเสมียร์เลือดโดยวิธี Slide method

9.1.1. หยดเลือด (เลือดที่ใส่สารกันเลือดแข็งหรือเลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว) บน Slide 1 หยดเล็ก ๆ (ประมาณ 0.02 ml)

9.1.2. วาง Slide ให้อยู่ในแนวขนานกับโต๊ะ

9.1.3. ใช้ Spreader แตะกับหยดเลือดโดยทำมุมกับ Slide ประมาณ 30 - 40 องศาเซลเซียส

9.1.4. เมื่อเลือดแผ่กระจายตามขอบ Spreader แล้ว ลาก Spreader ไปตามความยาวของแผ่น Slide ด้วยความเร็วสม่ำเสมอจนสุด Slide เลือดก็จะกระจายติด Slide

9.1.5. ทำเสมียร์เลือดให้แห้งสนิทโดยเร็วด้วยการเป่าด้วยพัดลม หรือที่เป่าผม เพื่อให้น้ำระเหยจากเซลล์เม็ดเลือดทันที โดยที่เซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

9.2. การย้อมสี

9.2.1. นำเสมียร์เลือดที่แห้งแล้ววางบนถาดย้อมสี

9.2.2. หยดสี Wright-Giemsa stain ให้ท่วมสเมียร์เลือด ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ระยะนี้เป็นระยะ Fix

9.2.3. หยด Buffer solution ลงบน Slide ปริมาณเท่าสีให้พอดีเต็ม Slide เป่าเบาๆผสมให้เข้ากับสีทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ระยะนี้เป็นระยะย้อมสี

9.2.4. ล้าง Slide ด้วยน้ำสะอาด แล้วทำให้แห้งก่อนที่จะนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

9.2.5. ระยะเวลาในการ Fix และย้อมสีนี้ สามารถปรับขึ้นลงได้โดยให้การติดสีของเสมียร์ออกมาคุณภาพดีที่สุดตามเกณฑ์

9.3. การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (WBC Differential cell count)

9.3.1. ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเริ่มจากเลนส์วัตถุ (Objective lens) ที่มีกำลังขยายต่ำ (x10) เพื่อหาดูบริเวณที่จะใช้ในการตรวจ คือบริเวณที่เซลล์เม็ดเลือดแดงดี ไม่หนาหรือบางเกินไป โดยดูจากปลายสุดของเสมียร์ บริเวณที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวห่างๆ

9.3.2. เมื่อได้บริเวณที่ต้องการ ให้ใช้กำลังขยาย x100 เพื่อทำการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว 100 เซลล์ โดยนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวดังนี้

Cell type
Neutrophils
Lymphocytes
Eosinophils
Basophils
Monocytes
Atypical lymphocytes
Promyelocytes
Myelocytes
Metamyelocytes
Band form neutrophils
Plasma cells
Blast cells

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

Nucleated RBC (NRBC)
Other

การรายงานให้รายงานเป็นร้อยละเมื่อนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวครบ 100 เซลล์

9.4. การรายงานเม็ดเลือดแดงจากเสมียร์เลือด (RBC Morphology)

9.4.1. เลือกตรวจบริเวณที่ใช้ทำ Differential WBC count หรือบริเวณที่เม็ดเลือดแดงไม่เรียงซ้อนกัน ให้ตรวจความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงอย่างน้อย 5 0il power field (OPF)) ประมาณจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มีความผิดปกตินั้นๆ ในแต่ละ OPF ว่ามีสัดส่วนเท่าใด กับเม็ดเลือดแดงปกติ และให้ Grade ตามตารางข้าวล่างนี้

Grade	**Percent Abnormality**
4+	ประมาณ 100
3+	ประมาณ 75
2+	ประมาณ 50
1+	ประมาณ 25
Trace	ประมาณ 10
ไม่รายงาน	< 5

การรายงานให้รายงาน

- การติดสี (Staining) ของเม็ดเลือดแดงได้แก่ Normochromia,Hypochromia,Hyperchromia หรือ Polychromasia
- ขนาด (Size) ของเม็ดเลือดแดง (Anisocytosis)ได้แก่ Normocytosis,Microcyte หรือ Macrocyte
- รูปร่าง (Shape) ของเม็ดเลือดแดง (Poikilocytosis) เช่น Ovalocyte,Spherocyte,Tear drop cell,Sickle cell,Stomatocyte,Creanted cell,Acantocyte,Keratocyte หรือ Schisticyte
- Inclusion ในเม็ดเลือดแดง เช่น Howell-jolly ,Protozoa เป็นต้น

9.5. การรายงาน Platelets (Platelet estimation) ให้รายงานดังนี้

- Decrease เมื่อพบ < 5 ตัว / OPF
- Adequate เมื่อพบ 5 - 25 ตัว / OPF

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

- Increase เมื่อพบ > 25 ตัว / OPF

10. วิธีการควบคุมคุณภาพ

10.1.การควบคุมคุณภาพภายใน

10.1.1. ตรวจสอบการติดสีของเสมียร์เลือดดังนี้

	ผลการย้อมสี				
	Erythrocytes	Nucleus	Eosinophilc granules	Neutrophilc granules	Lymphocyte cytoplasm
Spec. Values	Pink	Violet	Red to deep red	Light violet	Blue

ตรวจสอบคุณภาพสีย้อม 1 ครั้งต่ออาทิตย์ และทุกครั้งที่เปลี่ยนน้ำยา Lot ใหม่ และบันทึกผลการตรวจสอบลงใน Internal quality control of routine stain for blood smear (FR-LAB-144)

11. สิ่งรบกวน

-

12. หลักการของวิธีการคำนวณผล รวมทั้งความไม่แน่นอนของการวัด

-

13. ขอบเขตค่าอ้างอิงในคน

-

14. ขอบเขตของค่าของผู้ป่วยที่รายงาน

-

15. การเตือนให้ระวัง

-

16. การแปลผล

-

17. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

ปฏิบัติตามหลักสากลในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อ

18. สิ่งที่อาจเป็นสาเหตุของความแปรปรวน

-

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

19. เอกสารอ้างอิง (Reference)

SD-HEM-002 (Laboratory manual of hematology .Department of clinical microscopy,Faculty of associated medical sciences .Chiang mai university.Fifth edition ,1994)

SD-HEM-003 คู่มือการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราห์สาขาโลหิตวิทยา. สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต