วิธีปฏิบัติ

Work Instruction

เรื่อง การตรวจเลือดหาเชื้อมาลาเรีย

โดยวิธี Thin film blood smear

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์

โรงพยาบาลลำพูน

รหัสเอกสาร WI-MIC-004		ทบทวน / แก้ไขครั้งที่ 16
ผู้จัดทำ	..... (นางสาวพิสุทธินี กันธารักษ์) นักเทคนิคการแพทย์	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี
ผู้ทบทวน	..... (นางสาวศิริพร นันตา) ผู้จัดการวิชาการ	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี
ผู้อนุมัติ	..... (นายครรชิต กิติมา) ผู้จัดการคุณภาพ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์	1 ก.พ. 64 วัน / เดือน / ปี

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	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”
		เปลี่ยนแปลงรหัสของวิธีปฏิบัติเรื่องการตรวจเลือดหาเชื้อมาลาเรีย จากเดิม WI-LAB-044 เป็น WI-MIC-004
		แก้ไขวิธีปฏิบัติให้เป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189
30 ต.ค. 2551	4	แก้ไขวิธีปฏิบัติให้เป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐาน ISO 15189
1 ต.ค.2554	5	แก้ไขรายชื่อผู้จัดทำจาก นางนิลุบล ชาลีพจน์ ตำแหน่งเจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญงาน เป็นนางสาวเกสรา ภูมาศ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์
1 ต.ค.2555	6	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค.2556	7	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.2557	8	แก้ไขผู้จัดทำเอกสารเป็น นางสาวพิสุทธินี กันธารักษ์แก้ไขชื่อกลุ่มงานเป็น กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์
2 ก.พ.2558	9	แก้ไขวิธีปฏิบัติตามผลการตรวจประเมิน ISO15189:2012, ISO15190:2003 เมื่อวันที่ 24-25 ธันวาคม 2557 - แก้ไขคำผิด
18 ส.ค.2559	10	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข
25 พ.ย.2559	11	แก้ไขหน้า 3 ชื่อเชื้อเดิมเขียนตัวหนังสือตรงเปลี่ยนเป็นตัวเอียง

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

วันที่	แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
25 พ.ย. 2560	12	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค. 2561	13	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข
1 ต.ต. 2562	14	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค. 2563	15	ทบทวนแล้วไม่มีการแก้ไข
1 ก.พ.2564	16	แก้ไขชื่อผู้ทบทวนเป็น น.ส.ศิริพร นันตา แก้ไขชื่อผู้อนุมัติเป็น นายครรชิต กิติมา

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

การตรวจเลือดหาเชื้อมาลาเรีย โดยวิธี Thin film blood smear

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจเลือดหาเชื้อมาลาเรียโดยวิธี Thin film blood smear

2. คำย่อ

OPF ย่อมาจาก Oil power field

3. หลักการของวิธีการทดสอบ

ความเข้มข้นของเชื้อมาลาเรียในกระแสโลหิตค่อนข้างกระจายไปทั่วกระแสโลหิตในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น Peripheral blood หรือ Internal blood วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียก็คือเจาะจาก Peripheral blood นำมาเสมียร์เป็นแผ่นบางๆบนสไลด์เรียกว่า Thin film blood smear แล้วจึงนำไปย้อมสี

การย้อมเซลล์ด้วยสีสองชนิดนั่นคือ 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

Cytoplasm ควรติดสีน้ำเงินเข้มหรือม่วงแดง ขึ้นกับชนิดของเชื้อมาลาเรีย Nucleus chromatin ควรจะติดสีม่วงแดง ในขณะที่ Stippling ควรติดสีส้มแดง,ชมพู ในขอบเขตของเม็ดเลือดแดง ถ้าตรวจพบ Stippling ของเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* และในระยะ Young tropozoiyes ของ *P. vivax* และ *P. ovale* เป็นเครื่องบอกชี้ว่าการย้อมสีนั้นมีขบวนการขั้นตอนในการย้อมสีที่ดี

4. รายละเอียดที่ต้องตรวจสอบ

4.1. ค่าความเป็นเส้นตรง

ไม่มี

4.2. ค่าความแม่นยำ

ไม่มี

4.3. ค่าความถูกต้อง

ไม่มี

4.4. ค่าความไม่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่มี

4.5. ระยะของการวัด

ไม่มี

4.6. ค่าจริงของการวัด

ไม่มี

4.7. ความไว

ไม่มี

4.8. ความจำเพาะ

ไม่มี

5. ประเภทหรือชนิดของตัวอย่าง

ใช้เลือดจากเส้นเลือด 1- 3 ml. ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็ง 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)

ไม่มี

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

9. ขั้นตอนการดำเนินการ

9.1. ตรวจรับตัวอย่างเลือดจากศูนย์รับตัวอย่าง

9.2. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของตัวอย่างเลือดที่ได้รับอีกครั้ง ให้ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจถ้าพบว่า

9.2.1. ปริมาณเลือดประมาณ < 0.5 ML.

9.2.2. ตัวอย่างเลือดมีก้อน Clotted

9.2.3. บรรจุในหลอดที่ใส่สารกันเลือดแข็งชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ EDTA Tube

โดยการโทรประสานหน่วยงานที่ส่งตรวจทันที บันทึกผู้ประสานงานและเวลาที่สานงาน และให้ดำเนินการเจาะตัวอย่างเลือดส่งมาใหม่

9.3. การเตรียมเสมียร์เลือด ให้ปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติเรื่อง การเตรียมเสมียร์เลือด การย้อมสี การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว การรายงานเม็ดเลือดแดง และการรายงานเกร็ดเลือด (WI-HEM-003)

9.4. การย้อมสี ให้ปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติเรื่อง การเตรียมเสมียร์เลือด การย้อมสี การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว การรายงานเม็ดเลือดแดง และการรายงานเกร็ดเลือด (WI-HEM-003)

9.5. การตรวจมาลาเรีย

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

9.5.2. เมื่อได้บริเวณที่ต้องการ ให้ใช้กำลังขยาย x100 เพื่อตรวจหาเชื้อมาลาเรีย

9.6. การรายงานให้รายงานดังนี้

- รายงานชนิด โดยระบุชื่อตระกูลและสายพันธ์ที่พบ
- รายงานระยะที่พบ
- รายงานจำนวน %

รายงานชนิด	รายงานระยะ	รายงานจำนวน %
Plasmodium vivax Plasmodium falciparum Plasmodium malariae Plasmodium ovalae	Ring form Growing tropozoites Schizont Gametocyte	การรายงานจำนวนเชื้อมาลาเรียให้เทียบจำนวนเชื้อกับจำนวนเม็ดเลือดแดง โดยพื้นที่ที่ตรวจนับต้องมีการกระจายของเม็ดเลือดแดงอย่างสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

		ประมาณ 150-200 เซลล์ต่อพื้นที่ แล้วนับจำนวนเชื้อรวมกันทั้งหมดภายใต้เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดง 100 เซลล์ ด้วยการนำ 10 ไปหารจำนวนที่นับได้ แต่กรณีที่มีจำนวนเชื้อมาลาเรียน้อยๆ อาจต้องหาเชื้อมาลาเรียภายใต้เม็ดเลือดแดงจำนวนมากกว่า 1,000 เซลล์

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

-ไม่ควรมีตะกอนสีอยู่ในแผ่นฟิล์ม

-ในกรณีที่ไม่มี Malarial pigment ซึ่งพบในขณะที่เชื้อมาลาเรียยังอ่อนๆและหรือในกรณีที่มีเชื้อน้อยพบได้ยาก ดังนั้น Blood smear จึงต้องการวิธีหรือขบวนการย้อมสีที่มาตรฐาน เพื่อช่วยเหลือในการวินิจฉัย

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

12. หลักการของวิธีการคำนวณผล รวมทั้งความไม่แน่นอนของการวัด

การคำนวณ Infection rate (IR) ให้เทียบจำนวนเชื้อกับจำนวนเม็ดเลือดแดง โดยพื้นที่ที่ตรวจนับต้องมีการกระจายของเม็ดเลือดแดงอย่างสม่ำเสมอประมาณ 150- 200 เซลล์ต่อพื้นที่ แล้วนับจำนวนเชื้อรวมกันทั้งหมดภายใต้เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ จากนั้นจึงหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อมาลาเรียต่อเม็ดเลือดแดง 100 เซลล์ แต่กรณีที่มีจำนวนเชื้อมาลาเรียน้อยๆ อาจต้องหาเชื้อมาลาเรียภายใต้เม็ดเลือดแดงมากกว่า 1,000 เซลล์ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

13. ขอบเขตค่าอ้างอิงในคน

-Malaria = non seen

14. ขอบเขตของค่าของผู้ป่วยที่รายงาน

-

15. การเตือนให้ระวัง

-

16. การแปลผล

-

17. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

ปฏิบัติตามหลักสากลในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อ

18. สิ่งที่อาจเป็นสาเหตุของความแปรปรวน

-

19. เอกสารอ้างอิง (Reference)

SD-MIC-003 วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการปรสิตวิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

SD-MIC-006 คู่มือการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ สาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต