|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ผู้จัดทำ :………………………….  (นางสาวนันทิยา ใหญ่ยงค์)  นักเทคนิคการแพทย์ | ผู้ทบทวน :…………………….  (นางวันเพ็ญ อุทัยพร)  นักเทคนิคการแพทย์ ผู้จัดการวิชาการ | ผู้อนุมัติ :…………………….  (นางวชิราภรณ์ ทองเทศ)  ผู้จัดการคุณภาพหัวหน้างานชันสูตรสาธารณสุข |

**ประวัติการแก้ไข**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| วัน เดือน ปี  ที่ใช้ | แก้ไขครั้งที่ | หน้าที่แก้ไข | รายละเอียดการแก้ไข | ผู้แก้ไข | ผู้อนุมัติ |
| 3 เมษายน 2556 | 0 | - | เอกสารออกใหม่ | - |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

### การตรวจ CBC

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นคู่มือในการตรวจ CBC แบบ manual สำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ

### 2. หลักการ

1. Hematocrit =ปั่นเลือดด้วยอัตราเร็วและเวลาคงที่แล้ววัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่อัดแน่น

เทียบกับปริมาตรทั้งหมดของเลือด

2. White blood cell count = เมื่อเจือจางเลือดด้วยน้ำยานับเม็ดเลือดขาวซึ่งสามารถสลายเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีนิเคลียส แต่คงสภาพเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียสไว้ได้ ในสัดส่วนที่เหมาะสม จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้บนแผ่นแก้วนับเม็ดเลือดขาว ซึ่งทราบปริมาตรแน่นอนจะสามารถคำนวณกลับไปเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดได้

* 1. Blood smear examination = การตรวจสเมียร์เลือดประกอบด้วย 3 ขั้นตอนที่สำคัญคือ

- การทำสเมียร์

- การย้อมสี

- การตรวจสเมียร์เลือด

**3. วิธีการตรวจ**

Hematocrit, White blood cell count**,** Blood smear examination

##### 4. เอกสารอ้างอิง

การทดสอบพื้นฐานห้องปฏิบัติการ โลหิตวิทยา ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2540 หน้า 44-104

**5. คำนิยามและคำย่อ**

* Hct = Hematocrit = ปริมาตรเลือดแดงอัดแน่น
* ลบ.มม = ลูกบาศก์มิลลิเมตร
* Microhematocrit centrifuge = เครื่องปั่นเหวี่ยงไมโครฮีมาโตคริต
* Microhematocrit reader = เครื่องอ่านฮีมาโตคริต
* Siligum wax = ดินน้ำมัน
* White blood cell count = การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว
* Mililits = mL = มิลลิลิตร

**6. เอกสารที่เกี่ยวข้อง**

**-**

**7. ความปลอดภัย**

- สวมเสื้อคลุมทุกครั้งที่ปฏิบัติงาน

- สวมถุงมือทุกครั้งที่สัมผัสสิ่งส่งตรวจ

#### 8. เครื่องมือเครื่องใช้

8.1 หลอดแก้วแคพิลลารี่เคลือบเฮปารินชนิดสีแดง

* 1. microhematocrit centrifuge ที่มีอัตราเร็ว 11,500-15,000 รอบ/นาที
  2. microhematocrit reader
  3. Siligum wax ดินน้ำมัน
  4. Autopipette ขนาด 200 µL. และ 20 µL.
  5. Tube แก้ว
  6. Tip
  7. แผ่นแก้วนับเม็ดเลือดและกระจกปิดทับ
  8. เครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด (Vortex mixer)
  9. กล้องจุลทรรศน์
  10. น้ำยา Turk , s solution
  11. สไลด์ฝ้า
  12. Cover slip
  13. สีย้อมสไลด์ (Wright, s Giemsa stain)
  14. ถาดย้อมสี พร้อมแท่งแก้ว
  15. Oil immersion

**9. น้ำยาและสารมาตราฐาน**

-

**10. วิธีดำเนินการ**

**Hematocrit (การหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น)**

1. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำปริมาณ 2.5 mL. สำหรับผู้ใหญ่และในเด็กที่เจาะเลือดได้น้อยใช้เลือด

0.5 mL. ใส่หลอดบรรจุสารกันเลือดแข็ง (EDTA) ผสมให้เข้ากันได้ดี หรือเจาะจากปลายนิ้วโดย

ใส่ใน Capillary tube สีแดง จำนวน 2 หลอด

1. ใช้หลอดแก้ว Capillary tube ดูดเลือดจากหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งโดยใช้หลอดแก้วแคพิลลารี่จุ่มในขวดเลือดหรือแตะที่ปลายนิ้วเอียงเล็กน้อยเลือดจะถูกดูดเข้าหลอดแก้วเองโดยแรงดึงแคพิลลารี่ให้ได้เลือด 2/3-3/4 ของความยาวหลอด
2. ปิดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน ต้องระวังอย่าดินน้ำมันเอียงเพื่อให้ถูกต้อง
3. นำไปปั่นด้วยเครื่อง hematocrit centrifuge ด้วยอัตราเร็ว 11,500-15,000รอบ/นาที นาน 5 นาที (เวลาและความเร็วรอบอาจมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับการคาลิเบรทเครื่องในแต่ละครั้ง

**White blood cell count (การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว)**

1. ใช้เลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) ใช้ Autopipette ดูดน้ำยา Turk , s solution 180 µL. ใส่ หลอด แก้ว และดูดเลือดจากหลอด EDTA 20 µL. (อัตราส่วน 1:20) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมเม็ดเลือด
2. หยดสารละลายลงในแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด(chamber)ปิดทับด้วยกระจก (cover slide) ตั้งทิ้ง

ไว้ ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวหยุดเคลื่อนที่

3. นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ (10x)ในช่อง W ที่มุม ทั้ง 4 ของแผ่นแก้วนับเม็ดเลือด นำเม็ดเลือดขาวทั้งหมดมารวมกันแล้วคำนวณเป็นจำนวนเม็ดเลือด ขาว ต่อ ลบ.มม.

4. เมื่อนับจำนวนเม็ดเลือดขาวเสร็จแล้วให้รีบทำความสะอาดอุปกรณ์ทันที โดยล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วเช็ด ด้วย 70% Alcohol

**การทำสเมียร์ (Blood smear)**

สไลด์ที่ใช้ในการทำสเมียร์ ต้องมีผิวเรียบไม่มีรอยขีดข่วนสะอาด (ผ่านการแช่แอลกอฮอล์เข้มข้น 95 % มาแล้ว ใช้ผ้าสะอาดที่ปราศจากไขมันและฝุ่นละอองเช็ด) เวลาจับสไลด์ให้จับเฉพาะที่ขอบห้ามใช้นิ้วแตะผิวของสไลด์ เพราะไขมันจากนิ้วจะทำให้เลือดไม่แผ่กระจายสม่ำเสมอ

1. เขียนชื่อคนไข้บนสไลด์ฝ้าแล้วหยดเลือดหยดเล็ก ๆ (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มม.) ห่างจากปลายสไลด์ข้างหนึ่งประมาณ 1 นิ้ว
2. นำ Cover slip ซึ่งใช้เป็น slide ในการไถ วางบนสไลด์ให้อยู่หน้าหยดเลือดประมาณ 1 ซม. และค่อย ๆ เลื่อน Cover slip ให้เข้ามาสัมผัสกับหยดเลือด รอให้หยดเลือดแผ่กระจายตัวดีเต็มสไลด์ตัวไถ (อาจใช้การขยับมือเล็กน้อยเพื่อให้เลือดแผ่กระจายตัวดี) เอียงสไลด์ตัวไถให้ทำมุมประมาณ 30-45 องศา แล้วไถเลื่อนทิศทางด้านหน้าด้วยความเร็วสม่ำเสมอและใช้เฉพาะน้ำหนักของตัวไถเท่านั้นเป็นแรงกด (ไม่ต้องใช้แรงกดจากมือ) สเมียร์ดีต้องไม่หนาหรือบางเกินไป ผิวเรียบ และมีความยาวประมาณ 2/3 ของความยาวสไลด์

**การย้อมสี (Staining)**

1. นำสเมียร์ที่แห้งแล้ว (ปล่อยให้แห้งเองหรือใช้ความร้อนจากโคมไฟส่อง) fix ใน 95 % Alcohol ในขวด chamber ทิ้งไว้ 1 นาที ระยะนี้เป็นระยะตรึง
2. นำสไลด์แช่ในขวด chamber ที่มีสี Wright Giemsa ทิ้งไว้ 1 นาที เป็นระยะย้อม
3. ซับให้แห้งแล้วแช่ใน Buffer ทิ้งไว้ 1 นาที
4. ล้างด้วยน้ำประปาเช็ดหลังสไลด์ให้สะอาด
5. ปล่อยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากโคมไฟหรือที่เป่าผม นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

**การตรวจสเมียร์เลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์**

1. ตรวจด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ (lower power, 10X)

เพื่อดูว่าการติดสีของเม็ดเลือดเป็นอย่างไร การกระจายตัวของเม็ดเลือดสม่ำเสมอหรือไม่ และเพื่อตรวจหาบริเวณมาตรฐาน (Standard area) คือบริเวณที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวไม่ซ้อนทับกันหรือห่างกันเกินไป

1. ตรวจด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายสูง (high power, 40X)

เพื่อดูว่าการติดสีของเม็ดเลือดเป็นอย่างไร การกระจายตัวของเม็ดเลือดขาวอย่างคร่าว ๆ โดยอาศัยหลักการดังนี้ คือ

|  |  |
| --- | --- |
| จำนวนเม็ดเลือดขาว / 40X | จำนวนเม็ดเลือดขาวโดยประมาณ / ลบ.มม. |
| 2-4 | 4,000-7,000 |
| 4-6 | 7,000-10,000 |
| 6-10 | 10,000-13,000 |
| 10-12 | 13,000-18,000 |

1. ตรวจดูด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายสูงสุด (oil immersion, 100X)

โดยเริ่มต้นจากบริเวณมาตรฐานที่เม็ดเลือดมีการเรียงตัวดี ไม่บางหรือหนาเกินไป หยด oil 1 หยดแล้วทำการเลื่อนแผ่นสเมียร์เลือดในลักษณะทิศทางรูปฟันปลาเพื่อดูรายละเอียดต่างๆ ดังต่อไปนี้

* 1. เม็ดเลือดขาว - นับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว นับให้ครบ 100%

- รายงานความผิดปกติของเม็ดเลือดขาว

* 1. เม็ดเลือดแดง - ความผิดปกติต่าง ๆ ของเม็ดเลือดแดง
* การรายงาน polychromasia
* การรายงาน red blood cell inclusion
* การรายงานเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียร์ (NRC)
  1. เกล็ดเลือด ดูปริมาณและขนาดของเกล็ดเลือด
  2. เชื้อมาลาเรีย

**11.การควบคุมคุณภาพ**

12. 1 External Quality Control คือ การควบคุมจากภายนอกหน่วยงานโดยร่วมทดสอบความ ชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 3 ครั้ง

12.2 คาลิเบรทเครื่องและตรวจเชคเครื่องอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

**12. การรายงานผลและการแปลผล**

- ความผิดปกติ ที่ขนาด (Annisocitosis) และความผิดปกติที่รูปร่าง (poikilocytosis) (เลื่อนดูอย่างน้อย 10 field) Hypochromia, target cell, Anisocytosis, microcyte, macrocyte, poikilocytosis ฯลฯ

ใช้รายงานระดับความรุนแรงดังนี้

การเกรด จำนวนที่พบ %

Few 5-10

1+ 11-25

2+ 26-50

3+ 51-75

4+ 76-100

- การายงาน poikilocytosis (ดูอย่างน้อย 10 field)

การเกรด จำนวนที่พบ / Oil field

1+ 1-3

2+ 4-6

3+ 4-12

4+ 12 ขึ้นไป

ถ้าพบเชื้อมาลาเรียต้องรายงานชนิดและระยะที่พบ

เกร็ดเลือด ให้ดูบริเวณมาตรฐาน ประมาณ 10 Oil field แล้วรายงานผลดังนี้

Adequate พบประมาณ 5-25 ตัว / Oil field

Decreased พบน้อยกว่า 5 ตัว / Oil field

Increased พบมากกว่า 25 ตัว / Oil field

Differential WBC Neutrophil % Eosinophil %

Band form % Monocyte %

Lymphocyte % Basophil %

Atypical Lymphocyte %

**13. ค่าปกติ**

ค่า ปกติ Hct ผู้ชาย 40-54 %

ผู้หญิง 38-47 %

เด็กแรกเกิด 53±10 %

ค่าปกติ WBC count เด็กแรกเกิด 18,100 / ลบ.มม.

เด็กอายุ 4 ปี 9,100 / ลบ.มม.

ผู้ใหญ่ 4,000- 11,000 / ลบ.มม.

**14. ข้อควรระวัง**

เลือดที่เจาะจากผู้ป่วยที่มีการเสียเลือดอย่างเฉียบพลัน (acute hemorchage) อาจทำให้ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่ตรงกับความเป็นจริงได้กล่าวคือ

- ถ้าเจาะเลือดทันทีหลังจากเสียเลือด จะทำให้ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูง เนื่องจาก

หลอดเลือดกำลังหดตัว

- ถ้าเจาะเลือดหลังจากการเสียเลือดประมาณ 4-5 ชั่วโมง จะทำให้ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำ เนื่องจากมีการซึมของน้ำเข้าไปในหลอดเลือด

- ค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นจะเปลี่ยนแปลงไป บ้างตามตำแหน่ง (position) ที่เจาะเลือดในคนที่สูบบุหรี่จัด ค่าปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่นจะสูงกว่าคนปกติเล็กน้อย

- ภาวะที่มีเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากกว่าปกติ มากกว่า 11,000 / ลบ.มม. พบได้ในภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย ไส้ติ่งอักเสบ มะเร็งเม็ดเลือดขาว หัด ไอกรน หญิงตั้งครรภ์ และการรักษาโรคบางอย่างที่ใช้ยาพวกสเตียร์รอยด์ เป็นต้น

- ภาวะที่จำนวนเม็ดเลือดขาว ลดลงมากกว่าปกติ ต่ำกว่า 4,000 / ลบ.มม. พบได้ในภาวะติดเชื้อไวรัส ไข้ไทฟอยด์ ไวรัสตับอักเสบ ตับแข็ง ภาวะเลือดจาง อพาสติก เบาหวาน ไข้เลือดออกและผู้ป่วยที่ได้รับการฉายรังสี เป็นต้น

- EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหมาะสมที่สุดในการทำ CBC ความเข้มข้นของ EDTA 1.50 ± 0.25 มก. / เลือด 1 มล. ในบางกรณีที่เจาะเลือดได้น้อยทำให้สัดส่วนของ EDTA และเลือดไม่ถูกต้อง โดยมีปริมาณ EDTA ที่มีมากเกินไป พบว่าถ้า EDTA มีความเข้มข้นมากกว่า 2 มก. / เลือด 1 มล. อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เม็ดเลือดเกิดขึ้น โดยทำให้เม็ดเลือดแดงเหี่ยว ซึ่งมีผลทำให้ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าต่ำลง ปริมาณฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีค่าสูงขึ้น และอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงมีค่าต่ำลง

- นอกจากนี้ยังทำให้เม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด ทำให้ค่าที่ได้สูงขึ้นได้ภายใน 30 นาที ถ้าหาก EDTA ที่มีความเข้มข้น มากถึง 4 มก. / เลือด 1 มล. ดังนั้นผู้ทำการเจาะเก็บเลือดเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ จึงควรที่จะคำนึงถึงความสำคัญของสัดส่วนระหว่าง EDTA และเลือดเลือดที่ให้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งในความเข้มข้นที่เหมาะสม ไม่ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเกิน 3 ชั่วโมง ถ้าไม่สามารถตรวจได้ทันที ให้แช่ 4  ๐C ภายใน 24 ชั่วโมง

- ทุกครั้งที่มีการเจาะเก็บเลือดโดยใช้สารกันเลือดแข็ง ต้องผสมเลือดให้เข้ากับสารกันเลือดแข็งเป็นอย่างดี และต้องมีการตรวจสอบเสมอว่ามีการแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นหรือไม่ การแข็งตัวของเลือดนั้นอาจเกิดเป็นบางส่วน (partial clot) จะไม่ใช้เลือดนั้นในการตรวจวัด ควรขอเจาะเก็บเลือดใหม่