

วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสารการตรวจนับจำนวน..Reticulocyte..count..ด้วยน้ำยา..Brilliant..cresyl..blue.....

รหัสเอกสารWI-LAB-H004.....

ผู้จัดทำ.....  (.....นายกฤษเวท.....แซ่ท้าว.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่จัดทำ.....5..มกราคม..2569.....
ผู้ทบทวน.....  (.....น.ส.จิราพร.....ใจชื่น.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่ทบทวน.....5..มกราคม..2569.....
ผู้อนุมัติ.....  (.....น.ส.จิราพร.....ใจชื่น.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่อนุมัติ.....6..มกราคม..2569.....
ลำเนาฉบับที่.....01.....	ผู้ถือครอง.....เทคนิคการแพทย์.....
แก้ไขครั้งที่.....00.....	วันที่เริ่มใช้.....2..ตุลาคม..2558.....
แก้ไขครั้งที่.....01.....	วันที่เริ่มใช้.....2..มกราคม..2566.....
แก้ไขครั้งที่.....02.....	วันที่เริ่มใช้.....6..มกราคม..2569.....
แก้ไขครั้งที่.....	วันที่เริ่มใช้.....
แก้ไขครั้งที่.....	วันที่เริ่มใช้.....

	วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 2 ของ 6
	เรื่อง : การตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ด้วยน้ำยา Brilliant cresyl blue method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H004	แก้ไขครั้งที่ : 02
ผู้จัดทำ : นายกฤษเวท แซ่ท้าว ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ วันที่ 5 มกราคม 2569			
ผู้รับรอง : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ วันที่ 5 มกราคม 2569			
ผู้อนุมัติ : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง หัวหน้างานเทคนิคการแพทย์ วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569			

รายการทบทวนและแก้ไข

แก้ไขครั้งที่	วันที่	รายละเอียดการแก้ไข
00	1 ตุลาคม 2558	- เริ่มจัดทำ
00	2 ตุลาคม 2558	- ประกาศใช้
01	1 มกราคม 2566	- ทบทวนเอกสาร
01	2 มกราคม 2566	- ประกาศใช้
02	5 มกราคม 2569	- ทบทวนเอกสาร
02	6 มกราคม 2569	- ประกาศใช้

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 3 ของ 6
เรื่อง : การตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ด้วยน้ำยา Brilliant cresyl blue method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H004	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจนับจำนวน Reticulocyte count โดยน้ำยา Brilliant cresyl blue ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

- 2.1 ประเมินการทำงานของไขกระดูกว่าสามารถตอบสนองต่อภาวะโลหิตจางได้หรือไม่
- 2.2 เป็นการแยกหาสาเหตุของโลหิตจางที่เป็นการติดตามการตอบสนองต่อการรักษาของโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก
- 2.3 เพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะซีด
- 2.4 ดูการตอบสนองของไขกระดูกหลังจากรักษาด้วยเคมีบำบัด

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 3.1 ใบแนบเอกสารน้ำยา Brilliant cresyl blue
- 3.2 ผศ.ดร.ยุพิน อนิวรรณอังกู. เกณฑ์มาตรฐานการจัดระดับความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง. (เว็บบล็อก). สืบค้นจาก http://www.mtcouncil.org/site/pulic/content/786/.attach/1768_เกณฑ์มาตรฐาน.pdf
- 3.3 นันทรัตน์/โฆมานะสิน และ อรทัย/ตั้งวรสิทธิชัย./เกณฑ์มาตรฐานการจัดระดับความผิดปกติ ของเม็ดเลือดแดง./สภาเทคนิคการแพทย์

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

Reticulocyte คือเซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อน (immature red blood cells) ซึ่งอยู่ในระยะท้ายของกระบวนการ erythropoiesis ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเม็ดเลือดแดง เป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียสแล้ว แต่ยังมี RNA และ micro-organelles เช่น ribosome และ mitochondria หลงเหลืออยู่ ซึ่งเมื่อทำการย้อมด้วยสี supravital stain เช่น สี Brilliant cresyl blue หรือ New Methylene Blue (NMB) จะพบการติดสีของ RNA ที่เกิดการรวมตัวกันเข้าเป็นจุดหรือเป็นร่างแหสีน้ำเงินอยู่ในไซโทพลาสซึม

Reticulocyte เจริญมาจากเซลล์ตั้งต้นของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในไขกระดูก ซึ่งเมื่อมีการเจริญถึงระดับหนึ่งแล้วจะมีการขับนิวเคลียสออกจากเซลล์และอยู่ภายในไขกระดูกประมาณ 2-3 วันก่อนที่จะออกสู่กระแสเลือด และใช้เวลาอีก 24-48 ชั่วโมงหลังจากเข้าสู่กระแสเลือดในการสร้างฮีโมโกลบินและพัฒนาไปเป็นเม็ดเลือดแดง จำนวนของ Reticulocyte ที่ตรวจพบในกระแสเลือด มีความสอดคล้องกับ

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 4 ของ 6
เรื่อง : การตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ด้วยน้ำยา Brilliant cresyl blue method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H004	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

ระดับการสร้างเม็ดเลือดแดงของไขกระดูก จึงสามารถนำมาใช้ประเมินการตอบสนองของไขกระดูกต่อภาวะโลหิตจางที่เกิดขึ้น เพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจในการตรวจวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาภาวะโลหิตจางในทางเวชปฏิบัติได้

5.หลักการ (Principle)

Reticulocyte คือเม็ดเลือดแดงอ่อนระยะที่เพิ่งขับ Nucleus ออกจาก Cell ระยะนี้ Ribosome จะมี RNA เป็นส่วนประกอบมากที่สุด และจะลดลงเรื่อยๆ จนหมดไปเมื่อเจริญเต็มที่เป็นเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) เมื่อย้อมด้วยสี Brilliant cresyl blue ในขณะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ สีจะเข้าไปในเซลล์และย้อมติด RNA ทำให้เห็นเป็นร่างแห (Reticulum)

6.เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated documents)

6.1 QP-LAB-001

6.2 QP-LAB-002

7.ความปลอดภัย (Safety)

7.1 ปฏิบัติงานโดยนักเทคนิคการแพทย์

7.2 สวมถุงมือ เสื้อกาวน์ (gown) แว่นตา และหน้ากากอนามัย ป้องกันการปนเปื้อนขณะ

ปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

7.4 น้ำยา Brilliant cresyl blue ใช้สำหรับตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ทางโลหิตวิทยาเท่านั้น

7.5 น้ำยา Brilliant cresyl blue จัดเป็นสารเคมีอันตราย เมื่อสัมผัสกับตาและผิวหนังจะเกิดการระคายเคือง หายใจเข้าไปจะระคายเคืองต่อระบบหายใจ ถ้ารับประทานเข้าไปจำนวนมาก จะเกิดอาการปวดหัว อ่อนเพลีย คลื่นไส้ เวียนหัว อาเจียน

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 5 ของ 6
เรื่อง : การตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ด้วยน้ำยา Brilliant cresyl blue method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H004	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

- 8.1 กล้องจุลทรรศน์
- 8.2 แผ่นสไลด์ฝ้า
- 8.3 น้ำยา Brilliant cresyl blue
- 8.4 แผ่นไอสไลด์
- 8.5 Test tube
- 8.6 Autopipette
- 8.7 Pipette tip yellow
- 8.8 Rack

9.สารมาตรฐาน (Standard)

-

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

- 10.1 หยดสี 1 หยดลงใน test tube หยดเลือด 2 หยด (~100 µl) Incubated room temp 15 นาที
- 10.2 หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์ เพื่อทำการ Blood smear
- 10.3 ปล่อย Blood smear ให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ 100x
- 10.4 เลือกระบิเวณ Blood smear ที่มีเม็ดเลือดแดงเรียงตัวสม่ำเสมอไม่ซ้อนทับกัน นับจำนวน Reticulocyte ต่อการนับเม็ดเลือดแดง 1,000 ตัว เทียบเป็น %

11.การคำนวณ (Calculation)

$$\%Reticulocyte = \frac{Reticulocyte\ count}{1,000} \times 100$$

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ตรวจสอบการติดสีที่เป็นลักษณะร่างแห RNA ของ reticulocyte

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 6 ของ 6
เรื่อง : การตรวจนับจำนวน Reticulocyte count ด้วยน้ำยา Brilliant cresyl blue method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-H004	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

- ตรวจสอบวันหมดอายุของสีย้อม
- สอบเทียบนาฬิกาจับเวลา (Timer) อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

การควบคุมคุณภาพภายนอก

-เข้าร่วมโครงการทดสอบประเมินคุณภาพ Reticulocyte count โดยองค์กรภายนอก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีละ 2 ครั้ง

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

14. การรายงานผล (Report of analysis)

ผู้ใหญ่ 0.2 - 2.0 % ($10-100 \times 10^9/L$)

เด็กแรกเกิด 2 – 6 % ($100-300 \times 10^9/L$)

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

15.1 สิ่งส่งตรวจ EDTA blood

15.2 การรักษาคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง หลังเก็บตัวอย่าง หรือถ้าหากส่งตรวจไม่ได้ทันทีให้นำหลอดเลือดแช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C

15.3 สามารถย้อมดู Inclusion body โดยเพิ่มเวลา Incubated เป็นเวลา 45 นาที

15.4 สิ่งรบกวน

15.4.1 สิ่งส่งตรวจที่ Clot / Partial Clot ทำให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

15.4.2 สิ่งส่งตรวจที่เจาะข้างให้น้ำเกลือ จะทำให้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

15.4.3 สิ่งส่งตรวจที่ Hemolysis - Howell-Jolly Body, Intracellular Parasite, Giant Platelet, Some Drug, Erythropoietic Protoporphyrin อาจมีผลรบกวนการตรวจได้

15.4.4 ในผู้ป่วยที่เพิ่งได้รับการให้เลือด จะทำให้ค่าลดลงได้จาก Dilutional Effect

15.4.5 การย้อม Reticulocyte เป็นการย้อมขณะที่ Cell ยังมีชีวิตอยู่ จึงควรใช้เลือดที่เจาะใหม่ (Fresh Blood) การใช้เลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง ควรทำภายใน 2 ชั่วโมง จึงจะได้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำ