วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสาร .....การตรวจ..Body..fluid..examination.....

รหัสเอกสาร .....WI-LAB-MS016.....

ผู้จัดทำ..... (.....นายกฤษเวท.....แซ่ท้าว.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่จัดทำ**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้ทบทวน..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่ทบทวน**.....5..มกราคม..2569.....
ผู้อนุมัติ..... (.....น.ส..จิราพร.....ใจชื่น.....) **ตำแหน่ง** .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	**วันที่อนุมัติ**.....6..มกราคม..2569.....
สำเนาฉบับที่.....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**.....

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

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจ Body fluid examination ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

ใช้ในการตรวจ Body fluid examination เพื่อช่วยในการวินิจฉัย และติดตามผลการรักษา ถ้าพบสิ่งผิดปกติ แสดงถึงความรุนแรงของโรคหรืออาจพบสาเหตุของโรคได้

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

3.1 บุญศรี มหากิตติคุณ. การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง. สืบค้นวันที่ 24 ตุลาคม 2567. จาก http://www.microscopy.ahs.chula.ac.th/newmicros/lecture/rbcwbccount.pdf

3.2 บุญทรง ปรีชาบริสุทธิ์กุล, อังกูรา สุโภคเวช. ปัสสาวะและสารน้ำ ,ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2543

3.3 อัมพารัตน์ ร่มไทรย์. The examination of body fluid. ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ ม.เชียงใหม่: 2532

3.4 กนกนาถ ชูปัญญา. คู่มือการตรวจทางห้องปฏิบัติการเล่ม 2 โครงการตำราศิริราช : 2528

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

- Red blood cell (RBC) = เซลล์เม็ดเลือดแดง
- White blood cell (WBC) = เซลล์เม็ดเลือดขาว
- cu.mm = ลูกบาศก์มิลลิเมตร
- CSF (Cerebrospinal fluid) = น้ำไขสันหลัง
- Peritoneal (ascites) fluid = น้ำจากช่องท้อง
- Pericardial fluid = น้ำจากช่องหัวใจ
- Pleural fluid = น้ำจากช่องปอด
- Synovial (joint) fluid = น้ำไขข้อ
- continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) = น้ำล้างไตทางช่องท้องแบบถาวร

5.หลักการ (Principle)

การตรวจสารน้ำในร่างกาย (Body fluid examination) ประกอบด้วย

5.1 Macroscopic examination

- สี (Color)
- ความใส (Transparency)
- Specific gravity

5.2 Microscopic examination

- การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) โดยใช้ Counting Chamber
- การแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) โดยการย้อมด้วยสี Wright Stain

5.3 Chemical examination

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 และหน้ากากอนามัยป้องกันการปนเปื้อนขณะปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

8.1 Counting chamber

8.2 Hand tally counter

8.3 น้ำเกลือ

8.4 Auto pipette

8.5 สี Wright-Giemsa stain

8.6 สไลด์ฝ้า

8.7 Cover glass

8.8 กล้องจุลทรรศน์

8.9 นาฬิกาจับเวลา

8.10 Immersion oil

8.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

9.สารมาตรฐาน (Standard)

-

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

การตรวจสารน้ำในร่างกาย (Body fluid examination) ประกอบด้วย

10.1 Macroscopic examination

10.1.1 ดูลักษณะสี (color)

10.1.2 ดูลักษณะความใส (Transparency)

10.1.3 ดูความถ่วงจำเพาะ (specific gravity)

10.2 Microscopic examination

10.2.1 การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) โดยใช้ Counting Chamber ผสมสารน้ำให้เข้ากันดีใช้ Autopipette ดูดสารน้ำที่ต้องการตรวจ แล้วหยดลงใน Counting Chamber 1 ข้าง

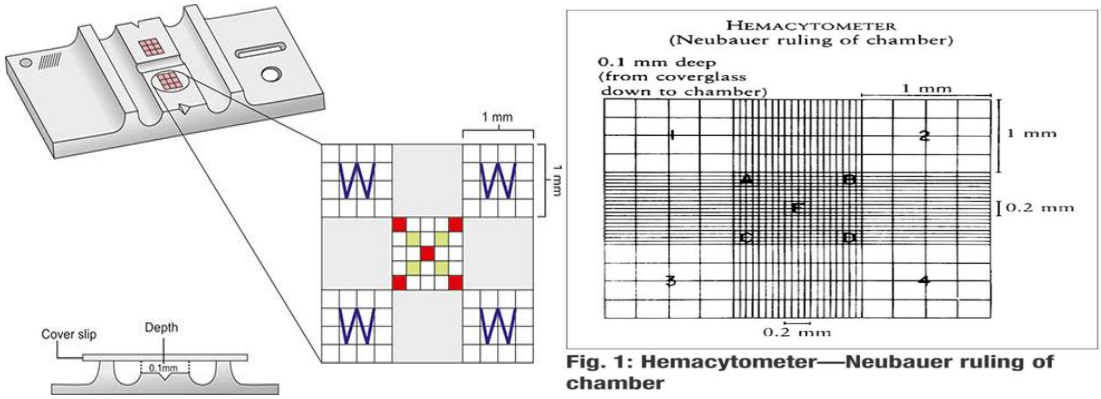
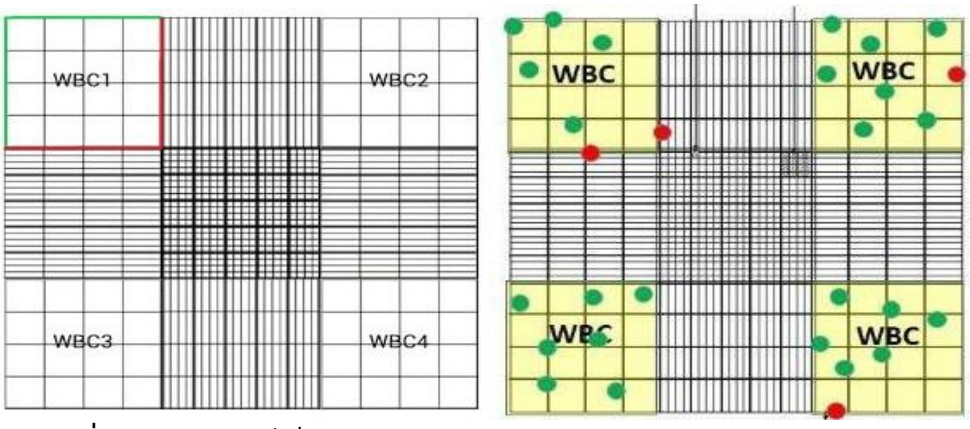


Fig. 1: Hemacytometer—Neubauer ruling of chamber

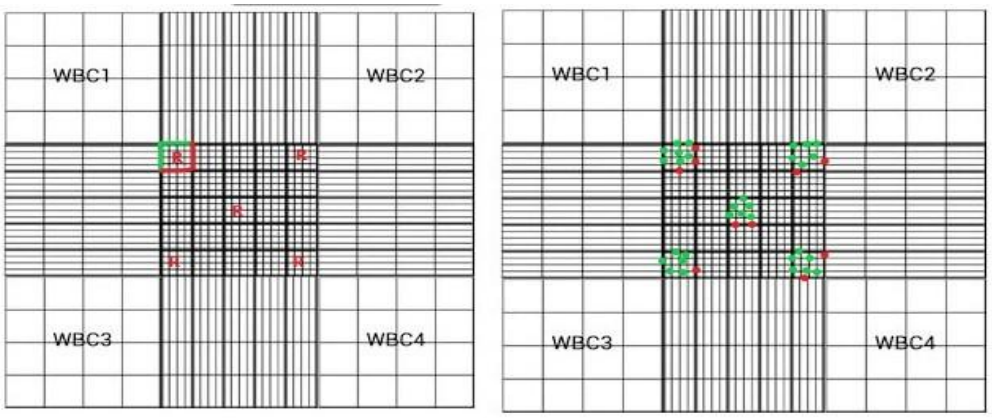
วิธีที่ 1 <u>การนับเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC)</u>

วิธีการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) จะนับจำนวน 4 ช่อง WBC ถ้าสารน้ำใสหรือขุ่นเล็กน้อย ไม่ต้องเจือจาง แต่ถ้าสารน้ำขุ่นให้เจือจางด้วย 0.9% NSS เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทับเส้นซ้ายและบน (เขียว) จะนับรวมไปด้วย ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทับเส้นขวาและล่าง (แดง) จะไม่นับ ดังรูปภาพนี้



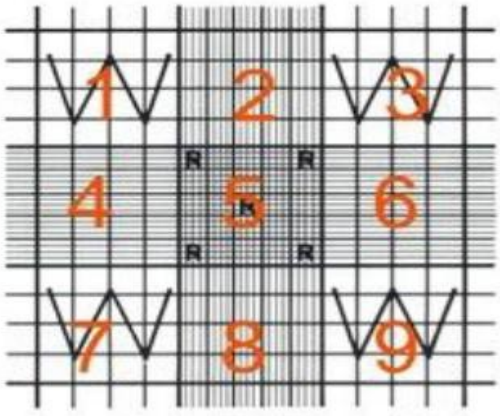
วิธีที่ 2 <u>การนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC)</u>

วิธีการนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) จะนับจำนวน 5 ช่อง RBC ถ้าสารน้ำใสหรือขุ่นเล็กน้อย ไม่ต้องเจือจาง แต่ถ้าสารน้ำขุ่นให้เจือจางด้วย 0.9% NSS เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ทับเส้นซ้ายและบน (เขียว) จะนับรวมไปด้วย ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ทับเส้นขวาและล่าง (แดง) จะไม่นับ ดังรูปภาพนี้



วิธีที่ 3 <u>การนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC)</u>

การนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) ในช่องใหญ่ (W) (1ช่อง มีปริมาตร 0.1 mm^3) ถ้าสารน้ำใสหรือขุ่นเล็กน้อย ไม่ต้องเจือจาง แต่ถ้าสารน้ำขุ่นให้เจือจางด้วย 0.9% NSS คือการนับเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) ที่ทับเส้นซ้ายและบน จะนับรวมไปด้วย ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทับเส้นขวาและล่าง จะไม่นับ ดังรูปภาพนี้



10.2.2 การแยกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBC) โดยการย้อมด้วยสี Wright-Giemsa stain

1) นำสารน้ำที่เหลือจากการนับไปปั่น โดยน้ำไขข้อปั่นด้วยความเร็ว 2,000-3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ส่วนน้ำไขสันหลังและสารน้ำอื่นๆ ปั่นด้วยความเร็ว 700-1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แยกน้ำใสส่วนบนไว้

2) ผสมตะกอนที่ได้จากการปั่นเข้าด้วยกัน

3) สเมียร์ตะกอนบน Slide เป็นรูปวงรี รอให้แห้ง แล้วทำการย้อม Slide ด้วยสี Wright-Giemsa stain (ตามวิธีปฏิบัติเรื่อง การย้อมสี Wright-Giemsa stain WI-LAB-H014)

4) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

5) ลงผลการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Cell Diff.) รายงานเป็นร้อยละเปอร์เซ็นต์

6) รายงาน abnormal cell ที่พบ

10.3 Chemical examination

- Glucose, Protein และ Albumin สิ่งส่งตรวจที่เป็นสารน้ำอื่นสามารถตรวจได้หมด ยกเว้น CSF ไม่สามารถตรวจ Protein และ Albumin ได้ ส่ง Out lab

-LDH, ADA ส่ง Out lab

11.การคำนวณ (Calculation)

11.1 <u>วิธีการคำนวณ เซลล์เม็ดเลือดขาว</u>

พื้นที่ 1 ช่อง เท่ากับ (กว้าง x ยาว x ลึก) 1 x 1 x 0.1 mm^3 = 0.1 mm^3

นับจำนวนทั้งหมด 4 ช่อง = 4 x 0.1 mm^3

ปริมาตรที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือดขาว = 0.4 mm^3

ดังนั้น ปริมาตร 0.4 mm^3 นับเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ = A cell

ปริมาตร 1 mm^3 จะนับได้ = $\frac{A \times 1 \text{ cell}}{0.4}$

กรณีมีการเจือจางตัวอย่างสิ่งส่งตรวจให้คูณ Dilution factor = $\frac{A \times 1 \text{ cell}}{0.4}$ x Dilution factor

11.2 <u>วิธีการคำนวณ เซลล์เม็ดเลือดแดง</u>

พื้นที่ 1 ช่อง เท่ากับ (กว้าง x ยาว x ลึก) 0.2 x 0.2 x 0.1 mm^3 = 0.004 mm^3

นับจำนวนทั้งหมด 5 ช่อง = 5 x 0.004 mm^3

ปริมาตรที่ใช้นับเซลล์เม็ดเลือดแดง = 0.02 mm^3

ดังนั้น ปริมาตร 0.02 mm^3 นับเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ = A cell

ปริมาตร 1 mm^3 จะนับได้ = $\frac{A \times 1 \text{ cell}}{0.02}$

กรณีมีการเจือจางตัวอย่างสิ่งส่งตรวจให้คูณ Dilution factor = $\frac{A \times 1 \text{ cell}}{0.02}$ x Dilution factor

11.3 <u>วิธีการคำนวณ เซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) และเม็ดเลือดขาว (WBC) ในช่องใหญ่ (W) (1ช่อง มีปริมาตร 0.1 mm^3)</u>

$$\text{จำนวนเซลล์/ } mm^3 = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ X Dilution factor}}{\text{จำนวนช่อง (W) X 0.1}}$$

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ตรวจสอบความสะอาดของแผ่น counting chamber และ cover slip
- ตรวจสอบคุณภาพวันหมดอายุของวัสดุ น้ำยา และสีย้อม wright stain ก่อนใช้งาน

การควบคุมคุณภาพภายนอก

- เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญการตรวจสารน้ำประจำวัน ศูนย์บริการเทคนิคการแพทย์ คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีละ 2 ครั้ง

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกผลลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

14. การรายงานผล (Report of analysis)

รายการทดสอบ	ผล	หน่วย
Specimen	- CSF - Peritoneal (ascites) fluid - Pericardial fluid - Pleural fluid - Synovial (joint) fluid - continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)	
Body fluid color	- Colorless ไม่มีสี - Pale yellow สีเหลืองอ่อน - Yellow เหลือง - Deep yellow เหลืองเข้ม - Bloody สีเลือด	

	- Milky สีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม - Purulent สีคล้ายหนอง - Xanthochromia สีชมพู ส้ม หรือเหลือง (ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจเป็น CSF)	
Body fluid Transparency	-Clear ใส -Turbid ขุ่น -Very turbid ขุ่นมาก	
Body fluid Specific gravity	รายงานเป็นตัวเลขที่ตรวจวัดได้	
Body fluid WBC count	รายงานจำนวนเซลล์ที่นับได้	cells/cu.mm
Body fluid RBC count	รายงานจำนวนเซลล์ที่นับได้	cells/cu.mm
Body fluid PMN	รายงานผลต่อจำนวนร้อยละของเม็ดเลือดขาว (%)	%
Body fluid mononuclear	รายงานผลต่อจำนวนร้อยละของเม็ดเลือดขาว (%)	%

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

15.1 สิ่งส่งตรวจ CSF, Peritoneal (ascites) fluid, Pericardial fluid, Pleural fluid, Synovial (joint) fluid และ continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)

15.2 การรักษาสภาพสิ่งส่งตรวจ รีบนำส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทันที เนื่องจากการทิ้งไว้นาน จะทำให้ cell แตกหรือเสียสภาพทำให้ดูได้ยาก กรณีไม่สามารถตรวจได้ทันที ให้เก็บไว้ที่

สิ่งส่งตรวจ	อุณหภูมิ	เก็บได้นาน
- CSF - Peritoneal (ascites) fluid - Pericardial fluid - Pleural fluid - continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)	4°C	48 ชั่วโมง
- Synovial (joint) fluid	อุณหภูมิห้อง	2-3 ชั่วโมง

15.3 สิ่งส่งตรวจที่มีก้อน clot จะทำให้มีจำนวน cell น้อยกว่าปกติ เนื่องจาก cell บางส่วน จะเข้าไปอยู่ในก้อน clot

15.4 กรณีที่เจาะถูกเส้นเลือดฝอย อาจทำให้มีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนได้

15.5 ในการดูใต้กล้องจุลทรรศน์ให้สังเกตผลึกบางชนิดที่สามารถพบได้ เช่น uric acid crystal ในน้ำเจาะเข่า หากพบให้รายงานผลด้วย เพราะมีความสำคัญในการวินิจฉัยของแพทย์

15.6 รายงานสิ่งผิดปกติ เช่น bacteria, yeast หากพบและไม่แน่ใจให้ยืนยันด้วยการย้อม Gram stain ดูอีกครั้ง

ตารางแสดงการจำแนก Transudate และ Exudate ในสารน้ำ Pleural และ Peritoneal effusion

ชนิดการตรวจ	Transudate	Exudate
<u>การรายงานลักษณะทางกายภาพ</u>		
สี (Color)	เหลืองอ่อน	เหลือง เขียว ชมพูแดง
ความใส (Transparency)	ใส (Clear)	ขุ่น
ความหนืด (Viscosity)	ไม่หนืด	หนืด
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity)	< 1.015	> 1.015
<u>การรายงานการนับเซลล์ (Cell count)</u>		
Pleural effusion	<1,000 cells/cu.mm	>1,000 cells/cu.mm
Peritoneal effusion	<300 cells/cu.mm	> 500 cells/cu.mm
<u>การรายงานการแยกชนิดเม็ดเลือดขาว</u>	ส่วนใหญ่เป็น Mononuclear cell	ระยะแรกเป็น Neutrophil ระยะท้ายเป็น Mononuclear cell

ตารางแสดง ค่าอ้างอิง (Reference values) ของสารน้ำ CSF (Cerebrospinal fluid)

การรายงานลักษณะทางกายภาพ	
สี (Color)	ไม่มีสี (Colorless)
ความใส (Transparency)	ใส (Clear)
การแข็งตัวเมื่อตั้งทิ้งไว้ (Clot formation)	ไม่พบ (Not found)
การรายงานการนับเซลล์ (Cell count) และการแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว (WBC differential cell)	
เม็ดเลือดขาว (WBC)	0-5 cells/cu.mm
PMN	0-6 %
Lymphocyte	40-80 %

Monocyte	15-45 %

ตารางแสดงการจำแนกชนิด การตรวจพบห้องปฏิบัติการ และพยาธิสภาพที่พบในโรคข้อผิดปกติ ในสารน้ำ Synovial fluid

กลุ่ม	การตรวจทางห้องปฏิบัติการ	พยาธิสภาพที่สำคัญ
กลุ่ม 1 ไม่มีการอักเสบ	น้ำสีเหลืองใส ความหนืดดี เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 2,000 cells/cu.mm พบ neutrophil น้อยกว่า 30 %	พบในข้อเสื่อม
กลุ่ม 2 มีการอักเสบ	น้ำสีเหลืองขุ่น ความหนืดลดลง เม็ดเลือดขาว 2,000-5,000 cells/cu.mm พบ neutrophil มากกว่า 50 %	ข้ออักเสบชนิด Rheumatoid และ SLE
กลุ่ม 3 มีการติดเชื้อ	น้ำสีเหลืองปนเขียวขุ่น ความหนืดลดลง เม็ดเลือดขาว 10,000-20,000 cells/cu.mm พบ neutrophil มากกว่า 90 %	ติดเชื้อจากแบคทีเรีย
กลุ่ม 4 การพบผลึก	น้ำขุ่นหรือสีน้ำนม ความหนืดลดลง เม็ดเลือดขาว 50,000 cells/cu.mm พบ neutrophil มากกว่า 90 % พบผลึกยูริค	โรค Gout และ Pseudogout
กลุ่ม 5 มีเลือดออก	น้ำสีแดงขุ่น ความหนืดลดลง เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า cells/cu.mm พบ neutrophil น้อยกว่า 50 % พบเม็ดเลือดแดง	ข้อได้รับการบาดเจ็บ ขาดปัจจัยการแข็งของเลือด

ตารางแสดง ค่าอ้างอิง (Reference values) ของสารน้ำ Synovial fluid

Volume	0.1 – 3.5 ml
Color	Pale Yellow
Transparency	Clear
Viscosity	หนืดสูง
Clot formation	ไม่พบ
WBC Count	< 200 cells/cu.mm
WBC Differential - Monocyte /Macrophage - Lymphocyte - Neutrophil	 ประมาณ 60% ประมาณ 30% ประมาณ 10%