Laboratory 3.

Basic Hematologic Laboratory

ปฏิบัติการ

RBC and platelet differentiation

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. อธิบายลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่ปกติได้
2. อธิบาย terminology และลักษณะซึ่งแสดงความผิดปกติของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดในภาวะโรคต่าง ๆ ได้พอสังเขป

วิธีการปฏิบัติ

1. ดู Demonstration
   - เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดระยะต่าง ๆ
   - ลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่ปกติและผิดปกติ
   - ลักษณะของเสมียร์เลือดที่พบในภาวะโรคต่าง ๆ
2. ฝึกปฏิบัติ
   - ดูลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และการวินิจฉัยโรคจากแผ่นสไลด์ที่แจกให้
3. ศึกษา glass slide จากสไลด์ที่แจกให้ในภาวะโรคต่าง ๆ

   Normochromic normocytic RBC

   Iron deficiency anemia

   Thalassemia and hemoglobinopathy

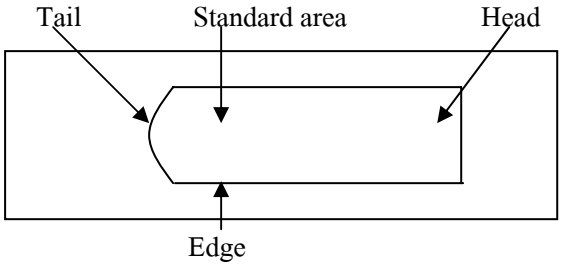
   - Thalassemia trait (β หรือ α1)
   - Homozygous E
   - Hb.H disease
   - β thal / Hb.E
   - β thal / Hb.E หลังตัดม้าม

   Autoimmune hemolytic anemia (AIHA)

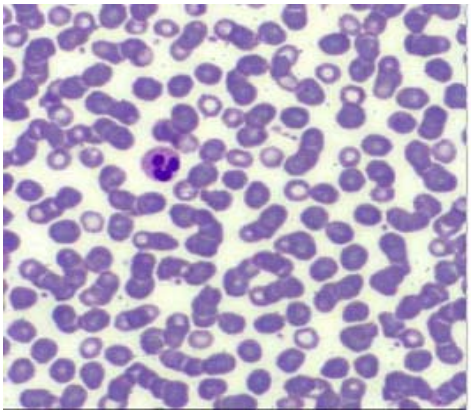
   G-6-PD deficiency

การตรวจเสมียร์เลือด

สเมียร์เลือดที่เตรียมได้จะถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ดังนี้

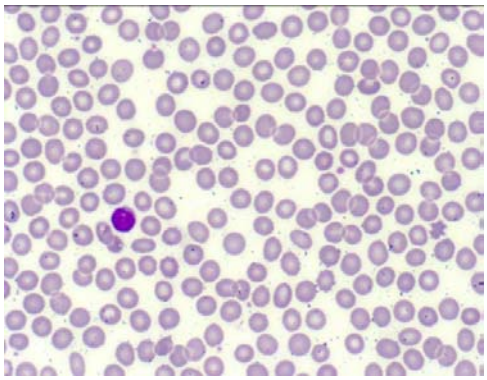


Head : เป็นส่วนของสเมียร์ด้านต้นหรือโคนของสไลด์ ที่มีเม็ดเลือดแดงหนาแน่นมาก จะพบเซลล์ที่มีขนาดเล็ก เช่น Lymphocyte จำนวนมากไม่เหมาะในการตรวจ (รูปที่1)



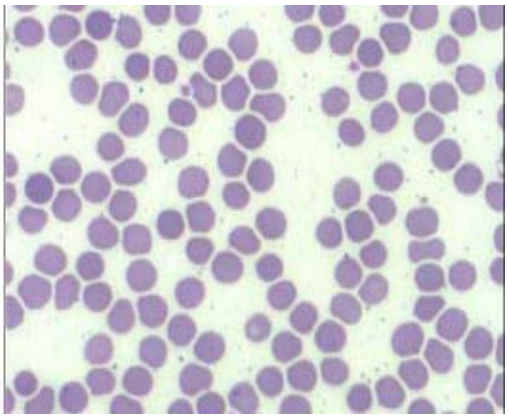
รูปที่1

Standard area หรือ body : เป็นส่วนของสเมียร์ที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวดี ซ้อนทับกันไม่เกิน 2 เซลล์ เม็ดเลือดแดงมีช่องว่างตรงกลาง (Central pallor) ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะในการตรวจ (รูปที่2)



รูปที่2

Tail : เป็นส่วนปลายของสเมียร์ที่ RBC กระจายตัวห่างกัน เม็ดเลือดแดงจะแบนและขนาดใหญ่กว่าความจริง ติดสีทึบ พบเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เช่น Monocyte จำนวนมาก ไม่เหมาะในการตรวจ (รูปที่3)



รูปที่3

Note: สำหรับส่วน Edge เป็นส่วนขอบด้านข้างของสเมียร์ ที่มีเม็ดเลือดขาวบางชนิด เช่น monocyte มาอยู่เป็นปริมาณมาก ไม่เหมาะในการตรวจ

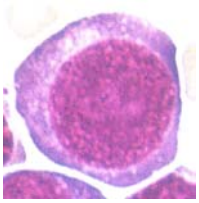
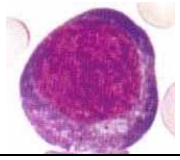
Red Blood Cell Morphology

การตรวจดูลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดง ควรตรวจดูด้วย low power field (10 X) เพื่อดูการติดสี การกระจายตัวของเม็ดเลือดแดง และเพื่อตรวจหาบริเวณมาตรฐาน (standard area) ซึ่งเป็นส่วนของสเมียร์ที่เม็ดเลือดแดงกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน (ถ้าซ้อนทับกันก็ไม่เกิน 2 เซลล์) และเม็ดเลือดแดงมีช่องว่างตรงกลาง (central pallor) ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะในการตรวจดูเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด

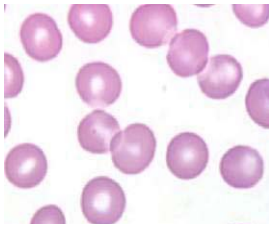
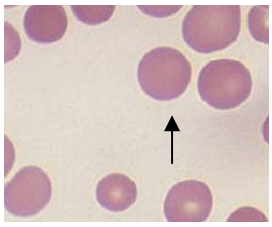
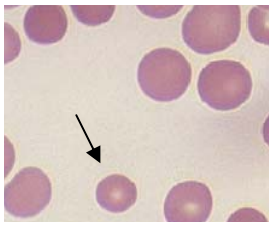
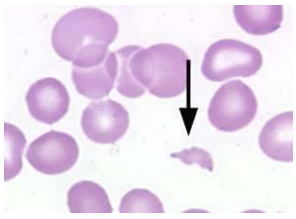
เม็ดเลือดแดงจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ขนาด และการติดสีตามพยาธิสภาพของผู้ป่วย ซึ่งอาจแบ่งความผิดปกติได้ดังนี้คือ

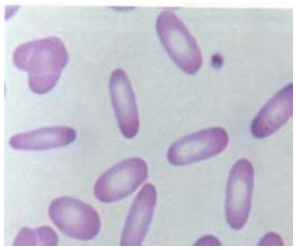
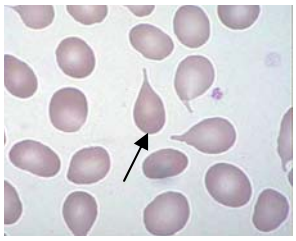
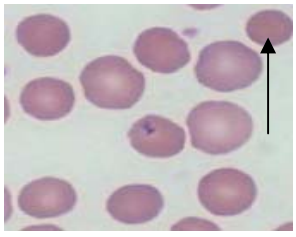
1. ความผิดปกติในขนาด (Variation is size หรือ Anisocytosis)
2. ความผิดปกติในรูปร่าง (Variation is shape หรือ poikilocytosis)
3. ความผิดปกติในการติดสี (Variation in staining)
4. การมีชิ้นส่วนอยู่ภายในเซลล์ (Inclusion)
5. ความผิดปกติในการกระจายตัวของเม็ดเลือดแดง (Variation in RBC distribution)

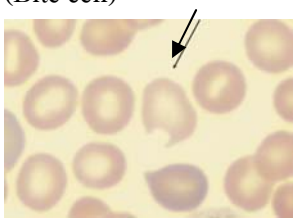
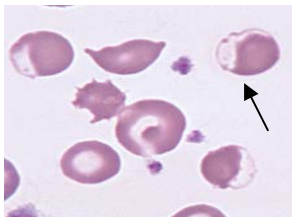
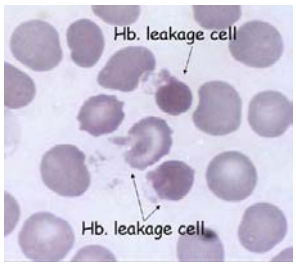
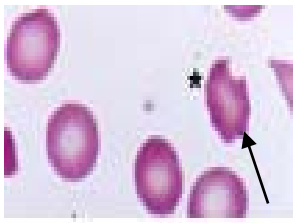
การแยกชนิดของเม็ดเลือดแดงใน Normoblastic Series

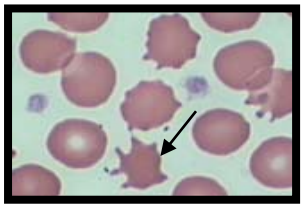
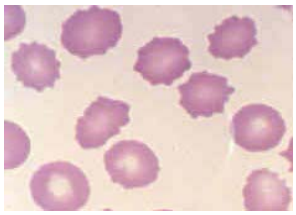
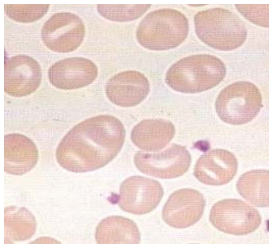
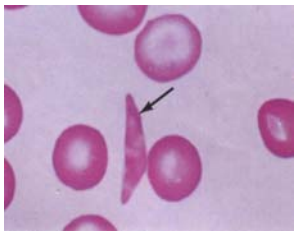
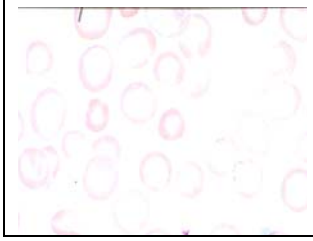
ชนิดของเซลล์/ลักษณะรูปร่าง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (µm)	Nucleus			Cytoplasm		
		Nucleoli	Chromatin	รูปร่าง	ปริมาณ	การติดสี	Granule
Pronormoblast 	20-25	1-4	หนาและหยาบ	กลมหรือรูปไข่	น้อย	สีน้ำเงินเข้ม	-
Basophilic normoblast 	16-18	0-1	หยาบมากขึ้น	กลมหรือรูปไข่	น้อย	สีน้ำเงินเข้มจัด	-
Polychromatic normoblast	9-12	-	หยาบมากขึ้นเห็นเป็นปื้น ๆ	กลมหรือรูปไข่	มีปานกลาง	สีม่วง	-
Orthochromatic normoblast	7-10	-	หยาบมากและอัดกันแน่น	กลมหรือรูปไข่ มักจะอยู่ค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์	มีมาก	สีชมพู	-
Polychromasia	8-10	-	-	-	มีมาก	สีม่วง	-
Mature RBC	7	-	-	-	มีมาก	สีชมพู ตรงกลางเซลล์ไม่ติดสี (Central pallor)	-

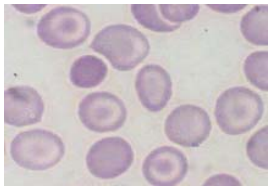
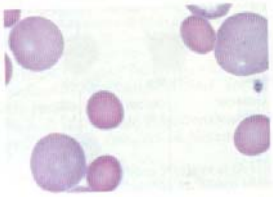
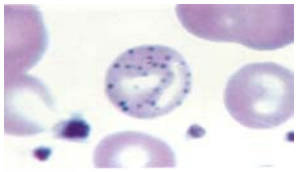
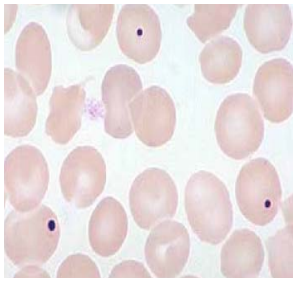
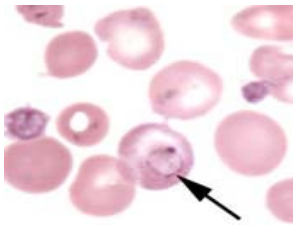
RBC Morphology

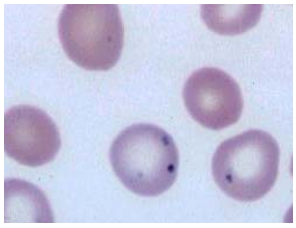
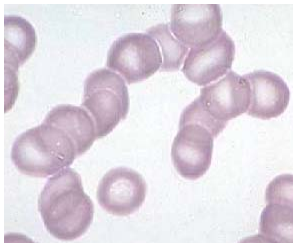
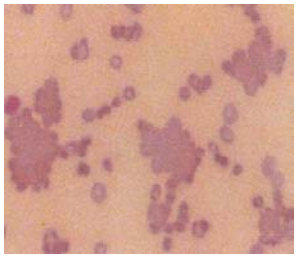
Terminology	Description	Associated disease
Normal RBC 	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7-8.5 μm. (เท่ากับนิวเคลียสของ small lymphocyte) ติดสีชมพูเข้มตรงขอบ แล้วค่อย ๆ จางเข้ามาในเซลล์ ตรงกลางเซลล์ไม่ติดสีเห็นเป็นช่องว่างขาว (Central pallor) ประมาณ 1/3 ของเส้นผ่าศูนย์กลาง	Normal
Macrocyte 	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง >8.5 μm. (มากกว่านิวเคลียสของ small lymphocyte)	Hemolytic anemia, Hyperthyroidism, acute blood loss, erythroblastic fetalis, megaloblastic anemia
Microcyte 	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง <6 μm. (น้อยกว่านิวเคลียสของ small lymphocyte)	Iron deficiency anemia, thalassemia, sideroblastic anemia
Schistocyte (Fragmented, helmet cell) 	เศษเซลล์ที่แตกออกมา ขนาดเล็กรูปร่างไม่แน่นอน	DIC, microangiopathic hemolytic anemia, hemolytic anemia, heart-valve hemolysis, severe burn, glomerulonephritis, thalassemia

Terminology	Description	Associated disease
Ovalocyte (Elliptocyte) 	รูปรี รูปไข่	Iron deficiency anemia, thalassemia, megaloblastic anemia, myelophthisic anemia, hereditary ovalocytosis (ovalocyte > 25%)
Tear drop (Dacreocyte) 	รูปหยดน้ำตา	Myelofibrosis with myeloid metaplasia, thalassemia, myelophthisic anemia
Hypochromic microcytic red cell	เม็ดเลือดแดงมีขนาดเล็ก และติดสีซีดกว่าปกติ	Iron deficiency anemia, Thalassemia
Spherocyte 	ขนาดเล็กกว่าปกติ รูปร่างกลมป๋อง ติดสีเข้มทึบทั้งเซลล์	Hereditary spherocytosis, hemolytic anemia, AIHA, post transfusion, water dilution hemolysis, fragmentation hemolysis, severe burn thalassemia,

Terminology	Description	Associated disease
Defected spherocyte (Bite cell) 	Spherocyte ที่เซลล์บกพร่อง (ขาด แหว่ง) ไป	G6-PD deficiency anemia, thalassemia
Eccentrocyte (RBC with contracted hemoglobin) 	RBC ที่ Hb. หดตัวรวมกันอยู่ด้านหนึ่ง	G6-PD deficiency, thalassemia
RBC with Hb. Leakage 	RBC ที่ Hb. กำลังแตกออกไป	G6-PD deficiency
Burr cell 	หนามสั้นทู่ จำนวน 2-6 อัน	Thalassemia, uremia, bleeding peptic ulcer, cancer of stomach, new born with liver disease

Terminology	Description	Associated disease
Acanthocyte (Spur cell) 	หนามแหลมยาวไม่เท่ากันจำนวน 2-5 อัน	Congenital acanthocytosis, alcoholic cirrhosis, abetalipoproteinemia, Post splenectomy, fat malabsorption
Crenated cell 	หนามแหลมเล็กอยู่รอบเซลล์สม่ำเสมอ จำนวน 10-30 อัน มักเกิดจาก artifact ไม่รายงาน	- ส่วนใหญ่เกิดจาก RBC เหี่ยว เป็น artifact - Renal insufficiency - Liver disease - Severe hemolysis - Severe burn
Stomatocyte 	ตรงกลางเซลล์เป็นช่องว่างคล้ายรูปปาก	Spherocytosis, hereditary stomatocytosis, alcoholic cirrhosis, obstructive liver disease, erythrocyte sodium pump defect
Sickle cell (Drepanocyte) 	โค้งคล้ายเคียวหรือเสี้ยวพระจันทร์	Hb S homozygote, sickle cell anemia
Hypochromia 	ช่องว่างตรงกลางมากกว่า 1/3 ของเส้นผ่าศูนย์กลางของ RBC หรือติดสีจางกว่าปกติ	Iron deficiency anemia, Thalassemia, pyridoxine responsive

Terminology	Description	Associated disease
Target cell (Codocyte, leptocyte) 	ติดสีที่ขอบและตรงกลางเซลล์ คล้ายเป้า	Iron deficiency anemia, Thalassemia, obstruction liver disease, post splenectomy state, renal disease
Polychromasia 	เม็ดเลือดแดงขนาดใหญ่ ติดสีม่วง	Hemolytic anemia
Basophilic stippling 	จุดเล็กขนาดไม่เท่ากันติดสีน้ำเงินกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วเซลล์	Hemolytic anemia, lead poisoning, thalassemia
Howell – Jolly bodies 	จุดกลมติดสีม่วงแดง ขนาด 1 µm. พบ 1-2 เม็ด	Hemolytic anemia, megaloblastic anemia, Post splenectomy
Cabot' s ring 	เส้นบาง ๆ ติดสีม่วงแดงเป็นรูปเลข 8 หรือเป็นวง	Sever anemia, dyserythropoiesis

Terminology	Description	Associated disease
Pappenheimer bodies 	จุดกลมขนาดเล็กมากติดสีน้ำเงิน พบ 1-4 เม็ด	Sideroblastic anemia
Rouleaux formation 	เรียงซ้อนกันเหมือนเหรียญบาท	Multiple myeloma, macroglobulinemia
Autoagglutination 	RBC เกาะกลุ่มกันเองเป็นก้อนไม่มี Standard area สำหรับ differential WBC รายงาน RBC with autoagglutination	AIHA

Platelet morphology

1. **Megakaryoblast**

Size: - ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 ไมครอน (μm)

Cytoplasm: - ติดสีน้ำเงิน, มี pseudopods ชัดเจน, พบ granules

Nucleus- มี nucleus เดียวและ กลม, chromatin ละเอียด, พบ nucleoli ได้หลายอัน

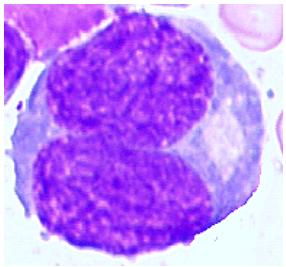
Megakaryoblast

2**. Promegakaryocyte**

Size: - ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 ไมครอน

Cytoplasm: - ติดสีน้ำเงินจางลง, มี pseudopods, พบ granules, สร้าง platelets ได้

Nucleus: - พบ2-4 lobes, chromatin หยาบขึ้น, พบ nucleoli หลงเหลืออยู่บ้าง



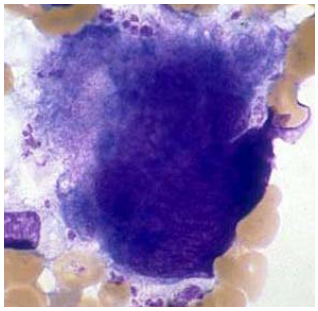
Promegakaryocyte

3**. Megakaryocyte**

Size: - ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30-300 ไมครอน

Cytoplasm: - ติดสีน้ำเงินจางลง, มี pseudopods, พบ granules มาก, สร้าง platelets ได้เกือบรอบ cell

Nucleus: -พบ 4, 8, 16, 32, 64 lobes, chromatin หยาบจับตัวกัน



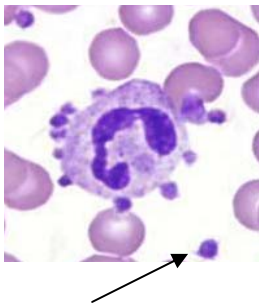
Megakaryocyte

4**. Platelet**

Size:- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 - 4 ไมครอน

Cytoplasm: - ติดสีน้ำเงินจางใส, มี granules ตรงกลาง

Nucleus:- ไม่มี

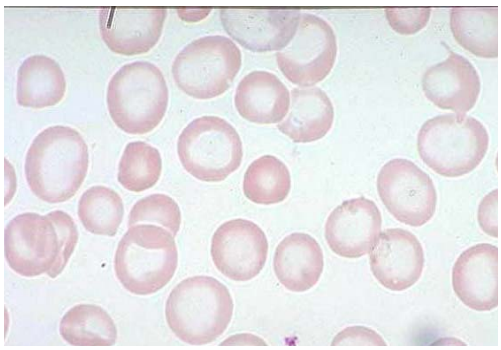


Platelet

ลักษณะของสเมียร์ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค

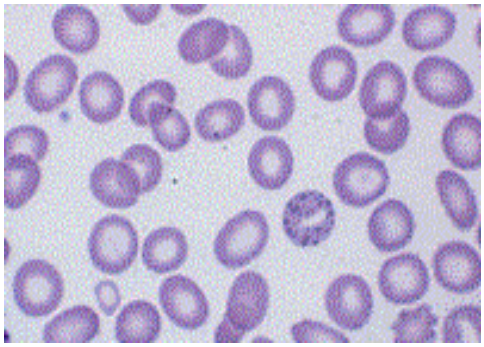
1. **Iron deficiency anemia**

   สเมียร์เลือดพบ hypochromia 1+ ถึง 3+ พบ anisocytosis และ poikilocytosis 1+ ถึง 2+ (hypochromic microcytic anemia) มี target cell จำนวนน้อย มักไม่มี spherocyte ไม่มี basophilic stripping ไม่มี polychromasia ยกเว้นในรายที่มีเลือดออกต่อเนื่องและได้รับการรักษา อาจพบ nucleated red cell (NRC) ได้จำนวนเล็กน้อย ในกรณีที่มีเลือดออกจากแผลในกระเพาะขนาดใหญ่ อาจพบมี NRC มากถึง 30/100 WBC ได้



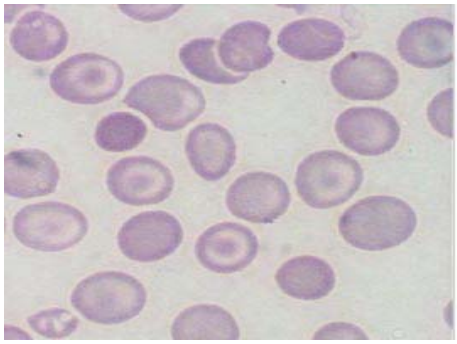
2. **Thalassemia trait (α1, β)**

   สเมียร์เลือดพบ hypochromia เล็กน้อย พบ anisocytosis, poikilocytosis, target cell บ้างเล็กน้อย มักไม่พบ spherocyte



3. **Homozygous Hb E (EE)**

   สเมียร์เลือดพบ target cell จำนวนมาก (มักพบมากกว่า 50%) ไม่มี hypochromia และ anisocytosis ชัดเจน ในบางรายพบ spherocyte เล็กน้อย อาจพบ hypochromia และ anisocytosis ได้ชัดเจนหากมีภาวะ iron deficiency anemia ร่วมด้วย

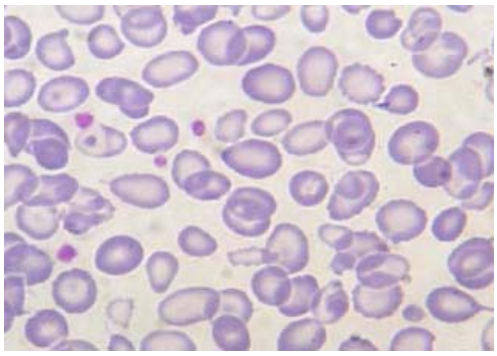


Homozygous Hb E (EE)

4. Hb H disease

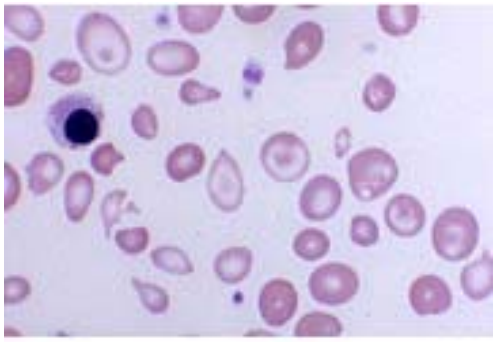
สเมียร์เลือดพบ hypochromia 1+ ถึง 2+ พบ anisocytosis และ poikilocytosis 1+ ถึง 3+ พบ polychromasia (ชัดเจนมากขึ้นเมื่อมีภาวะวิกฤตจากเม็ดเลือดแตก), target cell, spherocyte, burr cell, schistocyte, basophilic stripping

Hb H disease จะให้ผลบวกกับ inclusion body test



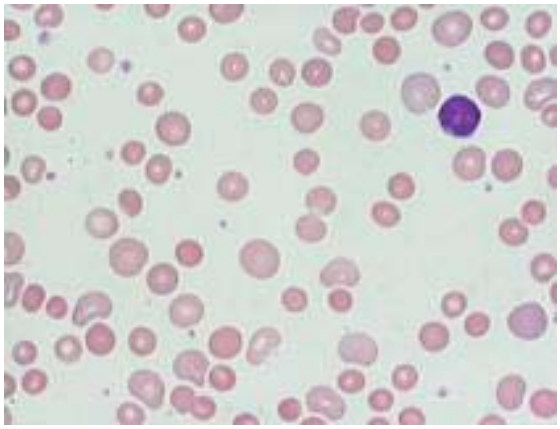
5. **β thal/Hb E (βE)**

สเมียร์เลือดพบ hypochromia 2+ ถึง 3+ พบ anisocytosis และ poikilocytosis 2+ ถึง 3+ พบ microcyte, target cell, burr cell, fragmented RBC, basophilic stripping, spherocyte พบ NRC ได้เล็กน้อย กรณีที่ได้รับการตัดม้ามแล้วจะพบ NRC ได้จำนวนมาก



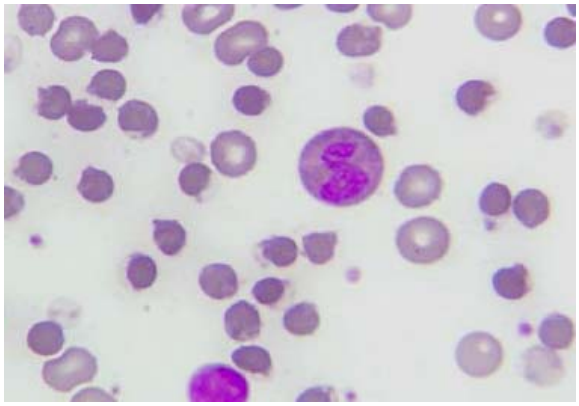
6. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA)

สเมียร์เลือดพบ spherocyte มาก ไม่มี hypochromia มี anisocytosis 2+ ถึง 3+ (มากกว่า hereditary spherocytosis) มี polychromasia พบ NRC เล็กน้อยจนถึงมาก ไม่มี burr cell, schistocyte (หากพบควรนึกถึง SLE) พบ autoagglutination ในบางราย



7. G-6-PD deficiency

สเมียร์เลือดจะพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงในขณะที่มี acute hemolysis เท่านั้น คือ พบ anisocytosis 1+ ถึง 2+ ไม่มี hypochromia, พบ NRC จากเล็กน้อยจนถึงมาก มี basophilic stripping, crenated cells, burr cell, schistocyte, spherocyte, eccentrocyte, RBC with Hb leakage



บรรณานุกรม

1. กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, การนับจำนวนเรติคูโลซัยต์ ใน : นันทรัตน์ โฆมานะสิน, นพมาศ เข็มทองหลาง, บรรณาธิการ, คู่มือปฏิบัติการโลหิตวิทยา เล่มที่ 1, พิมพ์ครั้งที่ 1, ขอนแก่น, ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537 : 103-106.
2. กุลนภา ฟู่เจริญ, คู่มือการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เพื่อประกอบการวินิจฉัยธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติ, ขอนแก่น, ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537: 139-150.
3. ณัฐยา แซ่อุ้ง, การวัดอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง, นันทรัตน์ โฆมนนะสิน, นพมาศ เข็มทองหลาง, บรรณาธิการ, คู่มือปฏิบัติการโลหิตวิทยา เล่ม 1, พิมพ์ครั้งที่ 1, ขอนแก่น, ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537 : 139-150.
4. สุนันท์ จำรูญ, นิพนธ์ กรีธาพล และคณะ, คู่มือการตรวจชันสูตรทางโลหิตวิทยา, กองมาตรฐานชันสูตรสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2529, 133-137.
5. อนงค์ เพียรกิจกรรม, เอกสารประกอบการอบรมโลหิตวิทยา ที่สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล.
6. Brown BA. Hematology, principles and procedures, 6th ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, 107-111.
7. Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology, 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 1975, 580-582.
8. Jones JA, Broszeit HK, Le Crone CN, Detter JC. An improved method for detection of red cell hemoglobin H inclusions, Am J Med Tech, 1981, 47, 94-96.

Laboratory 4.

Basic Hematologic Laboratory

ปฏิบัติการ

WBC differentiation

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. แยกชนิดของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดในระยะต่างๆ ได้
2. แยกเม็ดเลือดขาวปกติ ออกจากเม็ดเลือดขาวผิดปกติได้
3. อธิบายลักษณะของเม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติชนิดต่าง ๆ ได้

วิธีการปฏิบัติ

1. ดู Demonstration
   - Granulocytic series
   - Agranulocytic series
   - Leukemia
   - Abnormal white blood cell
2. ฝึกปฏิบัติ
   - ดูชนิดของ WBC ในระยะต่างๆ จาก Slide ที่แจกให้

เม็ดเลือดขาว (leukocytes)

เม็ดเลือดขาวแบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. Granulocytic series หรือ Polymorphonuclear leukocytes
2. Agranulocytic series หรือ Mononuclear leukocytes

1. Granulocytes (granulo = granular + cyte = cell)

เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูลเฉพาะ (specific granules) สามารถใช้ในการบอกแยกชนิดเม็ดเลือดขาวออกจากกันได้ โดยในระยะตัวแก่เม็ดเลือดขาวกลุ่มนี้จะมี cytoplasm ติดสีชมพูและมี nucleus หลายก้อน (lobes) แตกต่างกันที่ลักษณะการติดสีของแกรนูล

Neutrophil : แกรนูลเม็ดเล็กละเอียด ติดสีชมพูม่วง

Eosinophil : แกรนูลเม็ดใหญ่ขนาดเท่า ๆ กัน ติดสีส้ม-แดง

Basophil : แกรนูลขนาดเล็กบ้างใหญ่บ้าง ไม่เท่ากัน ติดสีม่วงอมดำ

2. Agranulocytes (agranulo = non granular + cyte = cell)

เป็นเม็ดเลือดขาวที่ไม่มีแกรนูลเฉพาะแต่อาจพบ azurophilic granules ได้ เม็ดเลือดขาวพวกนี้มีนิวเคลียสก้อนเดียว cytoplasm ติดสีฟ้า แตกต่างกันที่ chromatin และการติดสีของ cytoplasm

Lymphocyte : Nucleus รูปกลม รูปไข่หรือรูปไต chromatin หยาบเป็นปื้น (dense chromatin) cytoplasm ติดสีฟ้าอ่อนและใส แบ่งตามขนาดได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. Small lymphocyte

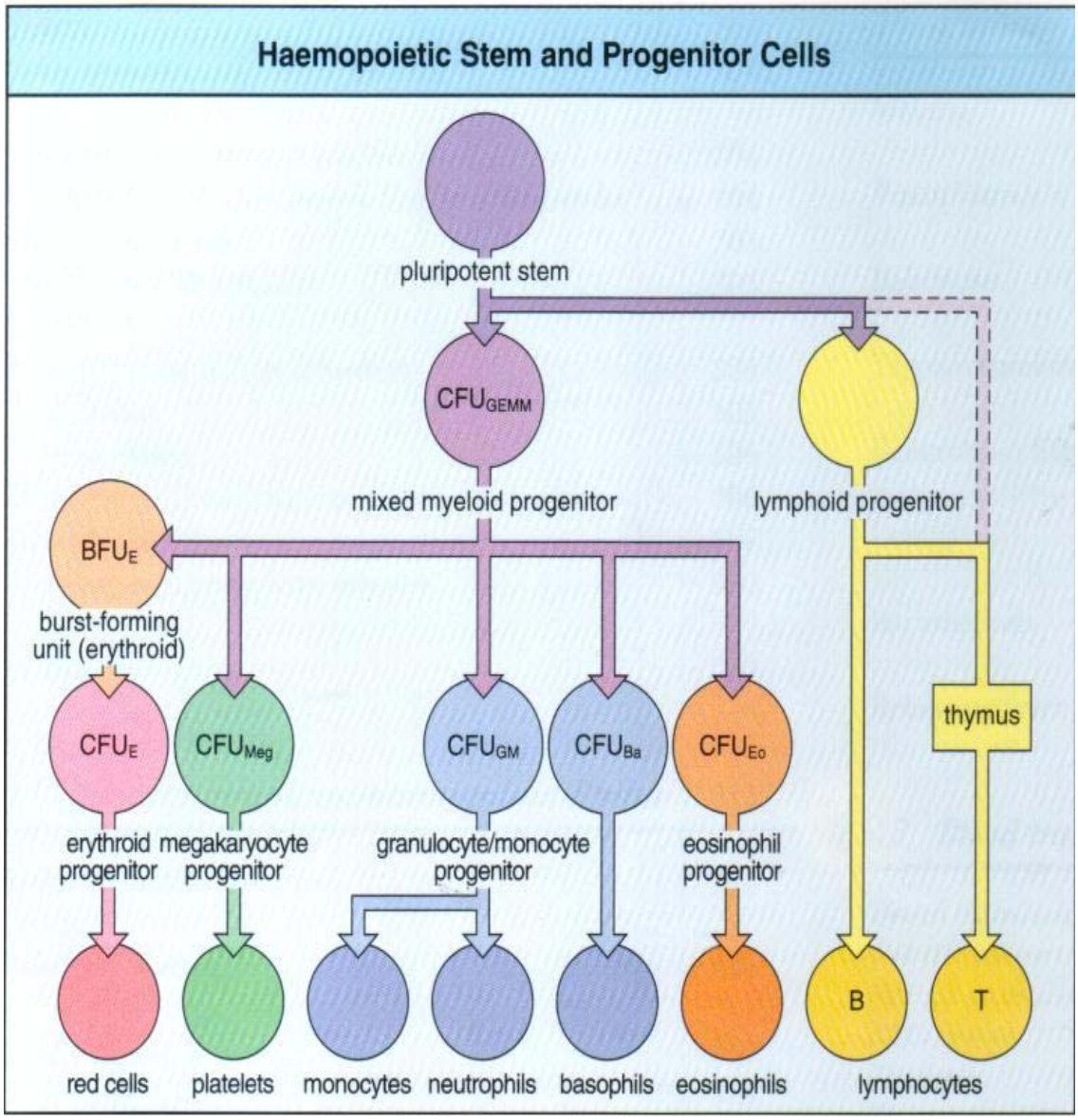
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-9 μm.
- Cytoplasm มีปริมาณน้อย
- อาจพบหรือไม่พบ azurophilic granules

2. Large lymphocyte

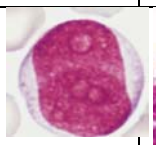
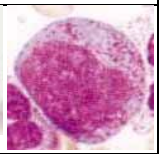
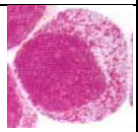
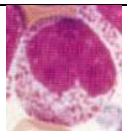
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 17-30 μm.
- Cytoplasm มีปริมาณมาก
- มักพบ azurophilic granules

Monocyte :

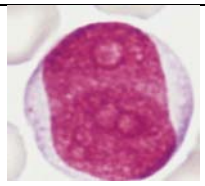
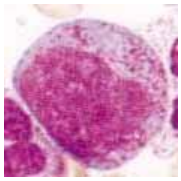
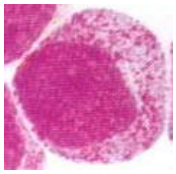
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 14-20 μm. จนถึง 30-40 μm. ประมาณ 2-6 เท่า ของเม็ดเลือดแดง
- Nucleus รูปร่างคล้ายคลื่นสมอง หรือคล้ายรูปไต หรือรูปเกือกม้า
- Chromatin หลวม (loose chromatin)
- Cytoplasm มีปริมาณมาก ติดสีฟ้าปนเทา
- อาจพบ azurophilic granules ได้


Haemopoietic Stem and Progenitor Cells
pluripotent stem
CFU$_{GEMM}$
mixed myeloid progenitor
lymphoid progenitor
BFU$_E$
burst-forming unit (erythroid)
CFU$_E$
CFU$_{Meg}$
CFU$_{GM}$
CFU$_{Ba}$
CFU$_{Eo}$
thymus
erythroid progenitor
megakaryocyte progenitor
granulocyte/monocyte progenitor
eosinophil progenitor
B
T
red cells
platelets
monocytes
neutrophils
basophils
eosinophils
lymphocytes

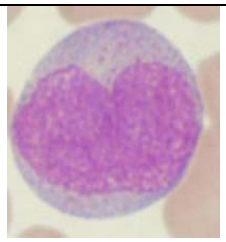
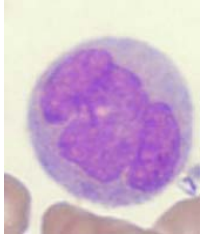
คุณสมบัติของ granulocyte ระยะต่าง ๆ

Stage	**Myeloblast**	**Promyelocyte**	**Myelocyte**	**Metamyelocyte**	**Band form**	**Segmented**
Morphology						
Cytoplasmic basophilia	+++	++	-	-	-	-
Azurophilic granules	+/-	+++	++	++	++	++
Specific granules	-	-	+++	++	++	++
Nucleoli	+++	++	+/-	-	-	-
Capacity to divide	+	+	+	-	-	-
Nuclear chromatin	Disperse→progressively coarser and more basophilia					
Nuclear size	Large→progressively smaller and then indented					
Nuclear shape	Mononuclear→indented→segmented					
Cell size	Progressively smaller					

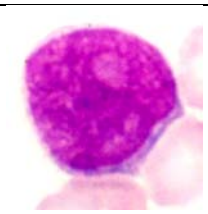
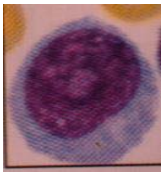
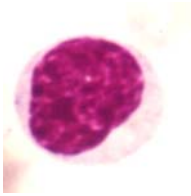
การแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวใน Granulocytic Series

ชนิดของเซลล์	ลักษณะรูปร่าง	Nucleus			Cytoplasm		
		Nucleoli	Chromatin	รูปร่าง	ปริมาตร	การติดสี	Granule
Myeloblast		2-5	ร่างแหละเอียดมาก	กลมหรือรูปไข่	มีน้อย	สีน้ำเงิน	+/-
Promyelocyte		1-2	ร่างแหละเอียดมาก	กลมหรือรูปไข่	มีปานกลาง	สีน้ำเงิน	1^0granules
Myelocyte		-	ร่างแหละเอียดแต่หยาบกว่า Promyelocyte เล็กน้อย	รูปไข่หรือเว้าเล็กน้อย	มีปานกลาง	สีชมพูปนน้ำเงิน	1^0&2^0 granules
Metamyelocyte		-	ร่างแหหยาบ	เว้ามากขึ้นไม่ถึงครึ่งของเส้นผ่าครึ่งนิวเคลียส	สีชมพู	สีชมพู	1^0&2^0 granules
Band form		-	ร่างแหหยาบ	เว้าเกินครึ่งหนึ่งของเส้นผ่าครึ่งของนิวเคลียสรูปเกือกม้า	สีชมพู	สีชมพู	1^0&2^0 granules
Segmented form		-	หยาบมาก	แยกเป็น lobe เชื่อมด้วยเส้นใย chromatin บาง ๆ	สีชมพู	สีชมพู	1^0&2^0 granules

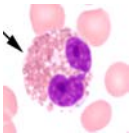
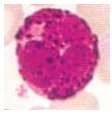
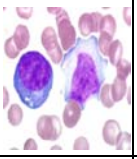
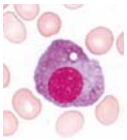
การแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวใน Monocytic series

ชนิดของเซลล์	ลักษณะรูปร่าง	Nucleus			Cytoplasm		
		Nucleoli	Chromatin	รูปร่าง	ปริมาตร	การติดสี	Granule
Monoblast		2-5	ร่างแหละเอียดและโปร่ง	กลม รูปไข่ หรือ คอดหยัก	ปานกลาง	สีฟ้าอ่อน หรือสีเทา	-
Promonocyte		1-2	ร่างแหละเอียด	กลม รูปไข่ หรือ คอดหยัก	ปานกลาง	สีฟ้าอมเทา	สีน้ำเงินปนแดง มีมาก ขนาดเล็กละเอียด
Monocyte		-	ร่างแหละเอียด	ลอนคล้ายคลื่นสมอง	มาก	สีฟ้าปนเทา หรือสีน้ำเงินหม่น	ไม่มีหรือมีสีน้ำเงินปนแดง ขนาดเล็กละเอียด

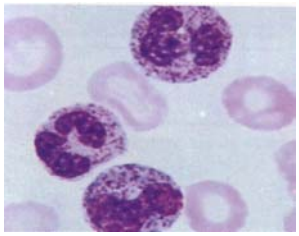
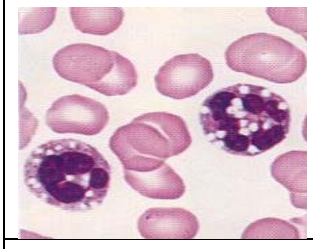
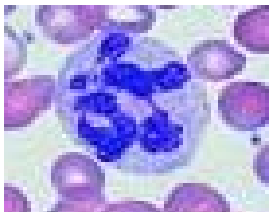
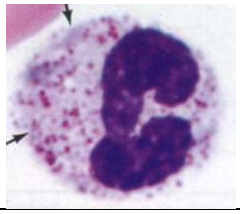
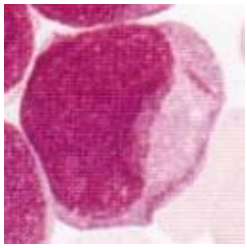
การแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวใน Lymphocytic series

ชนิดของเซลล์	ลักษณะรูปร่าง	Nucleus			Cytoplasm		
		Nucleoli	Chromatin	รูปร่าง	ปริมาตร	การติดสี	Granule
Lymphoblast		2-5	หยาบ ปานกลาง	กลมหรือรูปไข่	น้อย	สีน้ำเงิน	-
Prolymphocyte		1	หยาบกว่า Lymphoblast แต่ยังไม่เนียนเป็นก้อนเหมือน Lymphocyte	กลมหรือรูปไข่	น้อย	สีน้ำเงิน	-
Lymphocyte		-	เป็นก้อนใหญ่เกือบเต็มเซลล์	กลมหรือเว้าเล็กน้อย	น้อยหรือมาก	สีฟ้าใสหรือสีน้ำเงิน	ไม่มี หรือมี Azurophilic granules เล็กน้อย

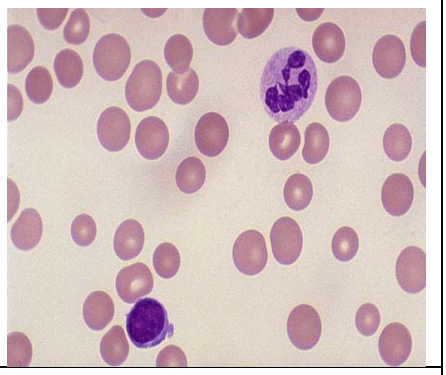
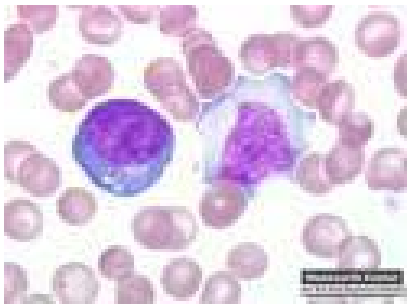
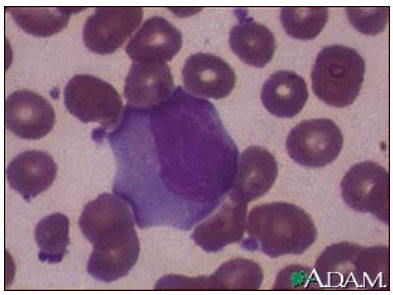
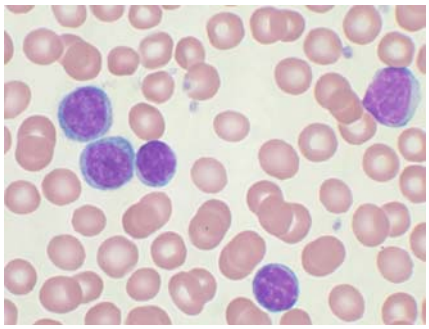
การแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวใน Granulocytic and Agranulocytic series

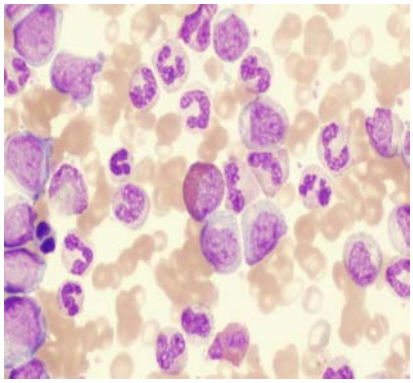
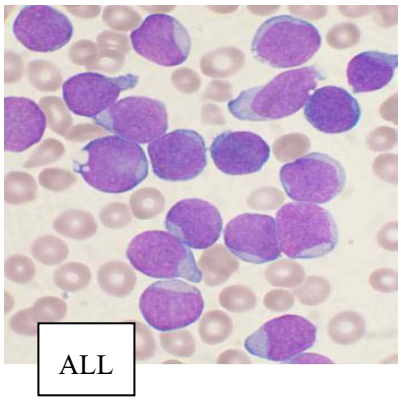
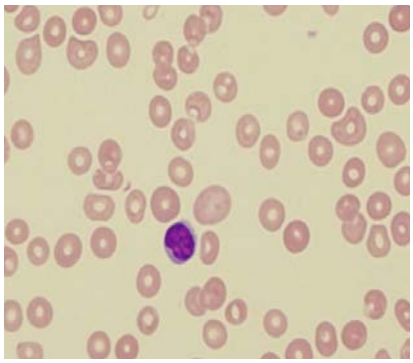
ชนิดของเซลล์	ลักษณะรูปร่าง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (um)	Nucleus			Cytoplasm		
			จำนวน Lobe	Chroma-tin	รูปร่าง	ปริมาตร	การติดสี	Granule
Neutrophil		10-15	2-5	หยาบ	ส่วนใหญ่มี 2-3 lobes	มาก	สีชมพู	ขนาดเล็กละเอียดติดสีชมพู
Eosinophil		12-17	2-3	หยาบ	ส่วนใหญ่มี 2 lobes	มาก	สีชมพู	ขนาดใหญ่เท่า ๆ กัน คล้ายเม็ดสาคูติดสีส้มแดง
Basophil		10-14	2-3	หยาบ	ถูกปกคลุมด้วย granules มองเห็นได้ไม่ชัดเจน	มาก	สีชมพู	ขนาดเล็กใหญ่ไม่เท่ากันติดสีม่วงดำ
Monocyte		14-20, 30-40	1	ร่างแหละเอียด	ลอนคล้ายคลื่นสมอง	มาก	สีฟ้าปนเทาหรือสีน้ำเงินหม่น	ไม่มีหรือมีสีน้ำเงินปนแดง ขนาดเล็กละเอียด
Lymphocyte		6-9, 17-30	1	หยาบเป็นก้อนใหญ่เกือบเต็มเซลล์	กลมหรือเว้าเล็กน้อย	น้อยหรือมาก	สีฟ้าใสหรือสีน้ำเงิน	ไม่มี หรือมี Azurophilic granules เล็กน้อย
Atypical Lymphocyte		9-35	1	หยาบเป็นกลุ่มก้อนอาจพบ mucleoli	กลม รูปไข่หรือคอดหยัก	ค่อนข้างมากอาจพบ vacuoles	สีน้ำเงินเข้มต่าง ๆ กัน	อาจพบ Azurophilic granules
Plasma cell		14-20	1	หยาบเป็นปื้นคล้ายซี่ล้อเกวียน	กลมหรือรูปไข่อยู่ค่อนไปข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์	มาก	สีฟ้า และมีช่องว่างขาวติดกับนิวเคลียส (Perinuclear halo)	ไม่มี

ความผิดปกติในลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดขาว

ลักษณะรูปร่าง	ลักษณะเซลล์	ภาวะที่พบ	การรายงาน
Toxic granules 	พบ granules ขนาดใหญ่ หยาบ ติดสีม่วงเข้มกว่าปกติ ใน segmented และ band form ของ neutrophil ซึ่ง granules นี้คือ azurophilic granules ที่ผิดปกติ	Acute infection, serious burn, drug poisoning	Seen
Vacuolization 	พบช่องว่างใน neutrophil มักพบร่วมกับ toxic granules	Septicemia	Seen
Hypersegmented neutrophil 	Neutrophil มี lobe มากกว่า 5 lobe	Megaloblastic anemia, chronic infection, hereditary hypersegmented neutrophil	นับรวมกับ segmented neutrophil
Dohle bodies 	เม็ดกลมรูปไข่ ขนาด 1-4 µm. ติดสีฟ้า-เทา อาจมีมากกว่า 1 เม็ด พบใน neutrophil	พบใน infection, Severe burns, post chemotherapy, malignant disease	Seen
Auer rod 	แท่งบาง ๆ ยาว 1-6 µm. ติดสีแดงพบใน myeloblast, promyelocyte และ monoblast ใน leukemia เท่านั้น	ช่วยแยก Acute non lymphoblastic leukemia (ANLL) หรือ AML ออกจาก Acute lymphoblastic leukemia เนื่องจาก Auer rod พบเฉพาะใน ANLL	-

ลักษณะของสเมียร์เลือดที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค

1. Megaloblastic anemia สเมียร์เลือดพบเม็ดเลือดขาวต่ำ และ/หรือ เกร็ดเลือดต่ำ ในบางรายพบ hypochromia มี anisocytosis 1+ ถึง 2+, poikilocytosis 1+ ถึง 2+, **macrocyte, macroovalocyte** พบ **hypersegmented neutrophil** ในบางรายอาจพบ NRC ได้บ้างจำนวนไม่มาก	
2. ไข้เลือดออก (acute hemorrhagic fever) สเมียร์เลือดพบมีภาวะเลือดข้น **เกล็ดเลือดต่ำ**จากน้อยถึงมาก บางรายมีเกล็ดเลือดปกติ (น้อยราย) จำนวนเม็ดเลือดขาวปกติ หรือต่ำเล็กน้อย (น้อยกว่า 2,000 /ลบ.มม. พบน้อยมาก) ไม่ค่อยพบ leukocytosis พบ **atypical lymphocyte** ได้เพิ่มขึ้นนอกจากในรายที่มีเลือดออกรุนแรง หรือในรายพร่อง G-6-PD เท่านั้น	
3. Infectious mononucleosis สเมียร์เลือดพบจำนวนเม็ดเลือดขาวสัปดาห์แรกมักปกติ (อาจมี leukopenia) จำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นในปลายสัปดาห์ที่ 1 อยู่ระหว่าง 10,000 ถึง 20,000 เซลล์/ลบ.มม. ไม่ค่อยพบจำนวนเกิน 30,000/ลบ.มม. พบ absolute lymphocytosis โดยมีlymphocyte เกิน 60% และมี **atypical lymphocyte** มากกว่า 15% บางรายพบเกล็ดเลือดต่ำหรือ hemolytic anemia ร่วมด้วย	
4. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) สเมียร์เลือด พบมี leukocytosis (10,000-400,000 เซลล์/ลบ.มม.) มี absolute lymphocytosis ส่วนใหญ่เป็น lymphocyte ขนาดเล็ก ๆ อาจพบ prolymphocyte หรือ lymphoblast เปอร์เซ็นต์ต่ำ ๆ พบตัวอ่อนของ neutrophil series ได้บ้าง เกล็ดเลือดต่ำในระยะท้ายของโรค บางรายมี evidence ของ autoimmune hemolytic anemia พบ autoagglutination	

5. Chronic myeloid leukemia (CML) สเมียร์เลือดพบมี leukocytosis มักพบระหว่าง 100,000 ถึง 400,000/ลบ.มม. (100-400 x10^9/L) พบชนิดเม็ดเลือดขาวตั้งแต่ myeloblast จนถึง neutrophils มี myeloblast กับ promyelocyte น้อยกว่า 10% พบมี eosinophilia และ basophilia ได้บ่อย พบ NRC เล็กน้อย ส่วนใหญ่จำนวนเกล็ดเลือดปกติหรือสูง มีน้อยรายที่เกล็ดเลือดต่ำ	
6. Acute leukemia สเมียร์เลือดพบมี Leukocytosis (พบได้บ่อยกว่า) บางรายมีจำนวนเม็ดเลือดขาวปกติ หรือต่ำกว่าปกติ พบ blast cell (จากไม่กี่เซลล์จนถึง 90-100%) ไม่มี hypochromia บางรายอาจพบ anisocytosis, poikilocytosis, burr cell, schistocyte (โดยเฉพาะในราย APL)	
7. Aplastic anemia เสมียร์เลือดไม่มี hypochromia แต่มี **pancytopenia** และ relative lymphocytosis ไม่มีหลักฐานของเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis)	

Laboratory 5.

Basic Hematologic Laboratory

ปฏิบัติการ

Blood smear examination

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. นับแยกจำนวนเม็ดเลือดขาวและรายงานผลได้
2. รายงานลักษณะและประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดได้
3. รายงานลักษณะของเม็ดเลือดแดงได้

วิธีการปฏิบัติ

1. ฝึกปฏิบัติ

นับแยกชนิดของWBC, รายงานลักษณะของ RBC, และรายงานลักษณะรวมทั้งประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากจาก Slide ของตนเองและที่แจกให้

การนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

(Differentiation of white Blood Cell Count)

นำเสมียร์เลือดที่ย้อมแล้วมาตรวจนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวออกจากกันคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ถ้าพบเม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส (NRC) ให้นับแยกออกจากเม็ดเลือดขาว จำนวน 100 เซลล์ แล้วรายงานเป็นจำนวน NRC/100 WBC การพบเม็ดเลือดขาวตัวอ่อน atypical lymphocyte, hypersegmented neutrophil ให้นับแยกออกจากกันแต่รวมอยู่ใน 100 เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว การพบ small lymphocyte กับ large lymphocyte ให้รวมเป็น lymphocyte ไม่ต้องนับแยกออกจากกัน

วิธีทำ

1. นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมด้วย Wright' s stain ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (10X) เพื่อดูการติดสีของเม็ดเลือด ดูการกระจายตัวของเม็ดเลือดว่าสม่ำเสมอดีหรือไม่ และเพื่อตรวจหาบริเวณ standard area
2. เปลี่ยนกำลังขยายไปที่กำลังขยายสูง (40X) เพื่อดูว่ามีเม็ดเลือดชนิดใดบ้าง แล้วทำการประมาณค่าของเม็ดเลือดขาวอย่างคร่าว ๆ จาสไลด์ เทียบกับค่าการนับเม็ดเลือดขาวจาก counting chamber ซึ่งควรจะไปด้วยกัน หยด immersion oil จำนวน 1 หยด แล้ว

เปลี่ยนกำลังขยายไปที่กำลังขยายสูงสุด (100 X : oil immersion lens) ปรับความชัดของไฟ

3. ตรวจนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเริ่มต้นจาก standard area บริเวณด้านบางไปทางด้านหนาของสเมียร์ตามแนวลูกศร ในลักษณะทิศทางรูปฟันปลาให้ครบ 100 เซลล์ แล้วรายงาน
4. ตรวจดูลักษณะการติดสี ขนาด รูปร่างของเม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือดตรงบริเวณ standard area พร้อมรายงานผล

ค่าปกติ

Type	Differential (%)	Absolute value (cells/cu.mm.)
Neutrophil, segmented	50 – 70	2,500 – 7,000
Neutrophil, band form	2 – 6	100 – 600
Lymphocyte	20 – 40	1,000 – 4,000
Monocyte	2 – 8	100 – 800
Eosinophil	1 – 3	50 – 300
Basophil	0 – 1	0 – 100

การประมาณจำนวนเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือด

การประมาณจำนวนเม็ดเลือดขาวจากสเมียร์เลือด เพื่อตรวจสอบกับค่าที่นับได้จาก counting chamber หรือเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติเป็นการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบอีกครั้งหนึ่งว่ามีความถูกต้องหรือไม่ ควบคุมการบันทึกผลผิด การรายงานผลผิด เป็นการเช็คผลการวิเคราะห์คร่าว ๆ สามารถประมาณได้ดังนี้คือ ใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (40X) นับจำนวนเม็ดเลือดขาวตรงบริเวณ Standard area จำนวน 10 field แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อ 1 field สามารถประมาณปริมาณเม็ดเลือดขาวได้คร่าว ๆ ดังนี้

WBC / HPF (cells / HPF)	Estimated WBC count (cells / cu.mm)
2 – 4	4,000 – 7,000
4 – 6	7,000 – 10,000
6 – 10	10,000 – 13,000
10 – 20	13,000 – 18,000

หมายเหตุ

1. การพบ toxic granules, vacuolization และ Dohle bodies ใน neutrophils ให้รายงานผลว่า seen
2. การพบ hypersegmented neutrophil ให้นับรวมอยู่ใน segmented neutrophils

การรายงานลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดง

โดยเลื่อนดูบริเวณ Standard area ประมาณ 10 oil field ซึ่ง 1 field จะมีเม็ดเลือดแดงประมาณ 200 cells แล้วรายงานความผิดปกติต่าง ๆ โดยใช้หลักเกณฑ์ดังนี้คือ

การให้เกรด	จำนวนที่พบ RBC ผิดปกติ		
Few	5-10%		
1+	11-25%	ประมาณ	1/4 cells /oil field
2+	26-50%	ประมาณ	2/4 cells /oil field
3+	51-75%	ประมาณ	3/4 cells /oid field
4+	76-100%	ประมาณ	> 3/4 cells /oid field

ได้แก่การรายงานเซลล์ต่อไปนี้

1. Anisocytosis
   - Macrocyte
   - Microcyte
2. Poikilocytosis
   - Schistocyte
   - Ovalocyte
   - Tear drop
   - Spherocyte
   - Defected spherocyte(bite cell)
   - Eccentrocyte
   - RBC with Hb leakage
   - Burr cell
   - Acanthocyte
   - Stomatocyte
   - Sickle cell
   - ฯลฯ
3. Hypochromia
4. Target cell

ยกเว้น polychromasia และชิ้นส่วนต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดงใช้หลักเกณฑ์ดังนี้ คือ

1. การรายงาน polychromasia

การให้เกรด	จำนวนที่พบ
Few	0-1 cells /oil field
1+	2-3 cells /oil field
2+	4-6 cells /oil field
3+	7-12 cells /oil field
4+	> 12 cells /oil field

2. การรายงานชิ้นส่วนต่าง ๆ ในเม็ดเลือดแดง รายงาน seen ไม่ว่าจะพบมากหรือน้อยก็ตาม เช่น Howell – Jolly bodies, basophilic stippling, Cabot' s ring, Pappenheimer bodies
3. การเปลี่ยนแปลงในการเรียงตัวของเม็ดเลือดแดง รายงาน seen ได้แก่ rouleaux formation, autoagglutination

หมายเหตุ

1. เม็ดเลือดแดงที่พบในคนปกติโดยทั่ว ๆ ไป จะมีขนาดแตกต่างกันได้เล็กน้อย อาจพบ burr cell, schistocyte และ polychromasia ได้ (พบได้น้อยกว่า 1%) อาจพบ ovalocyte, hypochromia และ microcyte (พบได้น้อยกว่า 3%) เพราะเม็ดเลือดแดงมีอายุ 120 วัน แล้วจะถูกทำลาย จึงอาจพบ cell ที่ผิดปกติบางตัวได้

2. การรายงาน macroovalocyte, acanthocyte, tear drop cell, spherocyte ต้องรายงานทุกครั้งที่พบ

3. การรายงานไม่แนะนำให้รายงาน 4+ เพราะมักจะพบเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะปกติปะปนอยู่ด้วยเสมอ

4. Anisocytosis จะรายงานในรายที่มี macrocyte หรือ microcyte ปะปนกับเม็ดเลือดแดงที่มีขนาดปกติ โดยผลรวมของการรายงานความผิดปกติของ microcytosis และ macrocytosis ต้องเท่ากับ anisocytosis

5. Poikilocytosis จะรายงานเมื่อพบเม็ดเลือดแดง รูปร่างผิดปกติหลาย ๆ อย่าง และผลรวมของ poikilocyte ทุกตัวต้องเท่ากับ poikilocytosis

6. การรายงาน target cell จะไม่รวมใน poikilocytosis และไม่ใช่ hypochromia

7. Polychromasia และ Target cell จะเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างขนาดใหญ่ แต่จะไม่นับรายงานรวมเป็น macrocyte

8. Sperocyte เป็นเซลล์ขนาดเล็กติดสีทึบจะไม่นับรายงานรวมเป็น microcyte สาเหตุการเกิด microcyte และ spherocyte ไม่เหมือนกัน

9. Target cell และ Stomatocyte อาจเกิดจาก artifact ได้ ควรตรวจดูหลาย ๆ field ถ้าไม่ใช่ artifact ต้องพบกระจายในหลาย field ไม่ใช่พบบริเวณเดียว

10. Tear drop อาจเกิดจาก artifact ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการไถสเมียร์โดยใช้แรงกดมากเกินไปหรือผู้ป่วยมีภาวะเลือดข้น เช่น โรคไข้เลือดออก Tear drop ที่เกิดจากการไถ สเมียร์ จะมีแนวแหลมไปในทิศทางเดียวกับที่ไถสเมียร์ แต่ถ้าเป็น Tear drop ที่เกิดจากพยาธิสภาพ ปลายของหยดน้ำตาของเซลล์จะมีหลายทิศทาง ไม่ไปในทิศทางเดียวกันกับปลายสเมียร์เลือด

11. การตรวจดู spherocyte ถ้าเป็น spherocyte จริงจะพบว่าตรงบริเวณ standard area จะพบ Spherocyte ขนาดเล็ก กลมป่อง ติดสีทึบ และพบเม็ดเลือดแดงที่มี central pallor ในบริเวณเดียวกันด้วย แต่ถ้าเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย spherocyte เซลล์จะมีลักษณะแบน ติดสีทึบทั้งเซลล์ แต่ขนาดจะไม่เล็ก ไม่กลมป่อง อาจจะเกิดจากการตรวจดูเซลล์เม็ดเลือดแดงตรงบริเวณปลายสเมียร์ (tail) ซึ่งเม็ดเลือดแดงจะถูกไถบางจนแบนราบติดกับแผ่นสไลด์ เพราะเป็นบริเวณที่มีเซลล์น้อย

12. Crenated cell ส่วนใหญ่เกิดจากเลือดอยู่ใน EDTA เป็นเวลานาน ซึ่ง EDTA เป็นสารที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ ทำให้น้ำภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงซึมออกนอกเซลล์ เซลล์เม็ดเลือดจะเหี่ยวเป็นหนามรอบเซลล์จึงไม่รายงาน แต่ถ้าสงสัยว่าเกิดจากพยาธิสภาพควรเจาะเลือดสดจากปลายนิ้วโดยตรง โดยไม่ใส่สารกันเลือดแข็ง

13. Pseudohypochromia เป็นเม็ดเลือดแดงที่มีลักษณะคล้าย hypochromia โดยบริเวณขอบเซลล์ติดสีเข้มและบริเวณที่ติดสีในเม็ดเลือดแดงจะเป็นวงเข้มเท่ากัน ไม่ได้ค่อย ๆ จางเข้ามาบริเวณกลางเซลล์เหมือน true hypochromia

14. การตรวจดู rouleaux formation ถ้าตรวจดูที่ปลายสเมียร์เกินไปจะไม่พบแต่ถ้าดูบริเวณที่ส่วนโคนของสเมียร์ (head of smear) อาจเห็นคล้าย rouleaux formation เพราะเม็ดเลือดอยู่กันหนาแน่น ดังนั้นจึงควรใช้กำลังขยาย low power (10X) ตรวจดูตรงบริเวณ standard area

15. ก่อนการรายงาน autoagglutination ควรทดสอบยืนยันโดยผสมเลือดหนึ่งหยดกับน้ำเกลือ 1 หยด แล้วปิดด้วย cover glass นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็น autoagglutination จริงกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจะยังอยู่ชัดเจน

การรายงานจำนวนและลักษณะของเกล็ดเลือด (platelet)

Platelet มีขนาดประมาณ 2-4 μm. รูปร่างเป็นแผ่นกลมหรือรูปไข่ ไม่มีนิวเคลียส cytoplasm ติดสีฟ้า มี azurophilic granules ติดสีชมพู ซึ่งมักจะรวมตัวกันอยู่บริเวณกลางเซลล์ การตรวจนับ platelet ให้ตรวจบริเวณ standard area ประมาณ 10 oil field หาค่าเฉลี่ยต่อ 1 oil filed แล้วรายงานผลดังนี้

Decreased : <5 cells / oil field

Adequate : 5-25 cells / oil field

Increased : >25 cells / oil field

การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือด

เป็นการประมาณจำนวนเกล็ดเลือดคร่าว ๆ จาก สเมียร์เลือดเทียบกับค่าที่นับจาก counting chamber หรือเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ เป็นการควบคุมคุณภาพผลการตรวจวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งผลที่ได้จากสเมียร์เลือดควรจะใกล้เคียงกับค่าที่ได้จาก counting chamber หรือเครื่องอัตโนมัติ ถ้าผลไม่ไปด้วยกัน โดยนับได้ต่ำแต่จากสเมียร์เลือดพบเกล็ดเลือดจำนวนมากอยู่เป็นกลุ่ม ๆ อาจจะเกิด partial clot จึงต้องเชื่อถือผลที่ได้จากสเมียร์เลือดเป็นหลักเพราะสามารถเห็นด้วยตา การประมาณจำนวนเกล็ดเลือดจากสเมียร์เลือดทำดังนี้คือ นับจำนวนเกล็ดเลือดตรงบริเวณ standard area ประมาณ 10 oil field แล้วคูณด้วย 1,600 จะได้ผลใกล้เคียงกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวิเคราะห์โดยการใช้ countig chamber วิธีนี้เป็นวิธีประมาณคร่าว ๆ ไม่ควรรายงานเป็นจำนวนเซลล์ cells / cu.mm โดยที่ไม่ได้ตรวจนับด้วย counting chamber ที่มีปริมาตรมาตรฐาน การประมาณเกล็ดเลือดต้องเลือกบริเวณ Standard area ให้ถูกต้อง ถ้าตรวจตรงบริเวณเม็ดเลือดแดงอยู่กันหนาแน่นจะมีปริมาณเลือดมาก จึงทำให้พบปริมาณเกล็ดเลือดมากด้วย แต่ถ้าดูบริเวณเม็ดเลือดแดงมีปริมาณน้อย เช่น ปลายสเมียร์ (tail) จำนวนเกล็ดเลือดก็มีปริมาณน้อยด้วย

หมายเหตุ

1. การตรวจพบว่า platelet ต่ำก่อนจะรายงานว่า decreased ควรตรวจเช็คสภาพสิ่งส่งตรวจว่า clot หรือไม่ ถ้า clot เป็นก้อนจะอยู่ในภาชนะเก็บสิ่งส่งตรวจแต่บนสเมียร์เลือดจะไม่พบ platelet แต่ถ้า clot เล็กน้อย (micro clot) จะไม่พบก้อน clot ในภาชนะเก็บสิ่งส่งตรวจ แต่จะพบ platelet เกาะกลุ่มบนสเมียร์เลือด ควรใช้ low power ตรวจดูสเมียร์เลือดว่ามีเยื่อ clot หรือไม่ ในกรณีที่เจาะจากปลายนิ้วแล้วใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง platelet จะเกาะกลุ่มไม่กระจายตัว เพราะ heparin ไม่มีคุณสมบัติที่ทำ

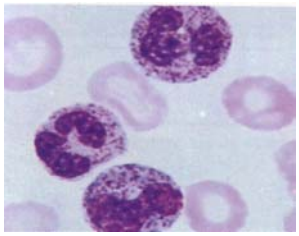
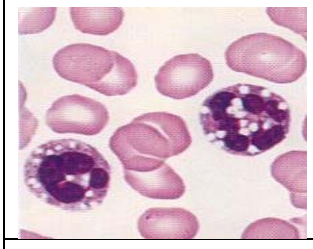
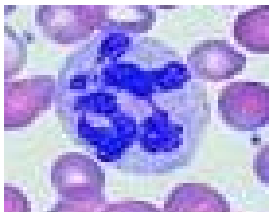
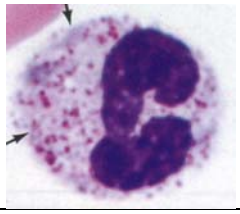
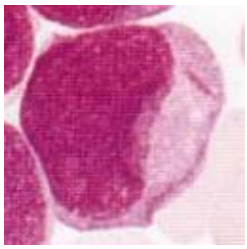
ให้ platelet กระจายตัวดี เหมือน EDTA เลือดที่เจาะจากปลายนิ้วมีโอกาสที่ platelet จะเกาะกลุ่มที่บริเวณโคนสเมียร์ (head) และปลายสเมียร์ (tail) ดังนั้นถ้าพบการเกาะกลุ่มจำนวนมากให้รายงานว่า adequate

2. Platelet ปกติจะมีขนาดประมาณ 2-4 μm. ถ้าพบ platelet ขนาดใหญ่กว่าปกติ (giant platelet) หรือมีรูปร่างผิดปกติ (bizarre platelet) ให้รายงานว่า seen
3. ถ้าพบ platelet ติดสีซีดโดยที่ไม่ได้เกิดจากการย้อมสีต้องรายงานด้วย เช่น adequate with paled stain การติดสีซีดที่เกิดจากการย้อมสีจะพบว่า platelet ติดสีซีดทุกเซลล์ แต่ถ้าเกิดจากมีปริมาณแกรนูลน้อยจะพบว่าบางเซลล์ติดสีซีด และบางเซลล์ติดสีปกติ (ใน Platelet ที่มีปริมาณแกรนูลปกติ)

การแยกเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกัน

ลำดับ	เซลล์	ลักษณะที่แตกต่างกันเด่นชัด
1	Monocyte	Cytoplasm ติดสีฟ้าเทา ฟ้าขุ่น
	Metamyelocyte	Cytoplasm ติดสีชมพู
2	Monocyte	Cytoplasm ติดสีฟ้าเทา ฟ้าขุ่น chromatin สานกันหลวม ๆ อาจพบ vacuoles ใน cytoplasm
	Large lymphocyte	Cytoplasm ติดสีฟ้าใส chromatin หยาบเป็นปื้น
3	Lymphocyte	Cytoplasm ติดสีฟ้าใส
	Orthochromatic normoblast	Cytoplasm ติดสีชมพู

ความผิดปกติในลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดขาว

ลักษณะรูปร่าง	ลักษณะเซลล์	ภาวะที่พบ	การรายงาน
Toxic granules 	พบ granules ขนาดใหญ่ หยาบ ติดสีม่วงเข้มกว่าปกติ ใน segmented และ band form ของ neutrophil ซึ่ง granules นี้คือ azurophilic granules ที่ผิดปกติ	Acute infection, serious burn, drug poisoning	Seen
Vacuolization 	พบช่องว่างใน neutrophil มักพบร่วมกับ toxic granules	Septicemia	Seen
Hypersegmented neutrophil 	Neutrophil มี lobe มากกว่า 5 lobe	Megaloblastic anemia, chronic infection, hereditary hypersegmented neutrophil	นับแยกเซลล์ออกจาก neutrophil แต่รวมอยู่ใน 100 เซลล์ของเม็ดเลือดขาว
Dohle bodies 	เม็ดกลมรูปไข่ ขนาด 1-4 µm. ติดสีฟ้า-เทา อาจมีมากกว่า 1 เม็ด พบใน neutrophil	พบใน infection, Severe burns, post chemotherapy, malignant disease	Seen
Auer rod 	แท่งบาง ๆ ยาว 1-6 µm. ติดสีแดงพบใน myeloblast, promyelocyte และ monoblast ใน leukemia เท่านั้น	ช่วยแยก Acute non lymphoblastic leukemia (ANLL) หรือ AML ออกจาก Acute lymphoblastic leukemia เนื่องจาก Auer rod พบเฉพาะใน ANLL	-

ตัวอย่างแสดงการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว จำนวน 100 เซลล์

	N	L	E	B	M	Band	NRC
10	///// //	///					
20	////	///	/		//		
30	///// ///	//					
40	/////	///	/		/		/
50	///// ///	/			/		
60	///// ////	/					
70	/////	//	/	/	/		
80	///// /	///			/		/
90	///// //	///					
100	///// ///	//					
รวม	65	25	3	1	6		2

Artifact

เป็นสิ่งที่ทำขึ้น หรือสิ่งที่ไม่จริง (คล้ายของจริง) พบได้เสมอในสเมียร์เลือด ทำให้ยากต่อการดูเซลล์ซึ่งอาจนำไปสู่การวินิจฉัยที่ไม่ถูกต้อง

Artifact ที่อาจพบได้ในสเมียร์เลือด

Artifact	Description
Pseudohypochromia	บริเวณที่ติดสีในเม็ดเลือดแดง จะเป็นวงเข้มเท่า ๆ กัน ไม่ได้ค่อย ๆ จางเข้ามาบริเวณกลางเซลล์
Spherocyte เทียม	บริเวณปลายสเมียร์ (tail) เม็ดเลือดแดงจะถูกไถจนแบนเซลล์จะติดสีทึบแบน ๆ คล้าย spherocyte แต่ไม่กลมป่องเหมือน spherocyte
Tear drop เทียม	ปลายหยดน้ำตาจะวางเรียงไปปลายสไลด์ ตามแนวการไถสเมียร์ เกิดจากการไถกดแรงเกินไป หรือในผู้ป่วยที่มีเลือดข้น เช่นเด็กแรกเกิด หรือผู้ป่วยไข้เลือดออก

Artifact	Description
Toxic granules เทียม	Neutrophil ทุกเซลล์จะมีเม็ดแกรนูลใหญ่เท่ากันหมดและพบใน neutrophil ทุกเซลล์ แต่ถ้าเป็น toxic granules จริง จะพบว่า neutrophil บางเซลล์มีเม็ดแกรนูลใหญ่ บางเซลล์มีเม็ดแกรนูลเล็ก เม็ดแกรนูลจะไม่เท่ากันและไม่พบใน neutrophil ทุกเซลล์
Vacuoles จาก EDTA blood ที่เก็บเลือดไว้นาน	เลือดที่เก็บไว้นาน จะพบว่า neutrophil และ monocyte จะกิน EDTA เกิด phagosome ทำให้ย้อมสีไม่ติดเห็นเป็นช่องว่างขาว (vacuole) จะไม่รายงาน การที่จะรายงานว่าพบ Vacuole ต้องพบ toxic granules ร่วมด้วยแต่การพบ toxic granules ไม่จำเป็นต้องพบ vacuole

Laboratory 6.

Bleeding disorders

ปฏิบัติการ

1. Tourniquet test
2. Bleeding time
3. Coagulation time
4. Clot retraction time
5. Clot lysis time

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถ ดังนี้

1. ทดสอบ hematostasis ที่เป็น screening test ได้ ได้แก่
   - Tourniquet test
   - Bleeding time
   - Clot retraction time
   - Coagulation time
   - Clot lysis time
2. แปลผลการทดสอบ แต่ละ test ได้

วิธีการปฏิบัติ

นิสิตทุกคนผลัดการเจาะเลือดเพื่อตรวจ

1. Tourniquet test
2. Bleeding time
3. Coagulation time
4. Clot retraction time and Clot lysis time

รายงานผลการทดสอบพร้อมแปลผลที่ได้จากการทดลอง

Tourniquet test

หลักการ

เป็นการทดสอบหาความแข็งแรง (integrity) ของผนังหลอดเลือดฝอย (Capillary wall) ปริมาณและคุณภาพของเกล็ดเลือด ผลการทดสอบจะบ่งบอกถึงคุณสมบัติของหลอดเลือด ปริมาณและคุณภาพของเกล็ดเลือดในการค้ำจุนผนังหลอดเลือด เมื่อเพิ่มความดันภายในหลอดเลือดฝอยด้วยเครื่องวัดความดันเลือด โดยรัดที่ต้นแขนเหนือข้อพับ ถ้าหลอดเลือดไม่แข็งแรง เกล็ดเลือดต่ำหรือคุณภาพของเกล็ดเลือดบกพร่อง จะมีเม็ดเลือดแดงผ่านออกมานอกหลอดเลือด ทำให้เห็นเป็นจุดเลือดออกสีแดงเล็ก ๆ (petichiae)

เครื่องมือ

เครื่องวัดความดันเลือด (Sphygmomanometer)

วัสดุอุปกรณ์

นาฬิกาจับเวลา

วิธีทำ

1. ตรวจดูบริเวณที่จะทดสอบว่าไม่มีจุดเลือดออกหรือรอยใด ๆ ซึ่งจะทำให้ดูผิดเป็นจุดเลือดออกหลังจากการทดสอบ
2. ใช้เครื่องวัดความดันรัดที่ต้นแขนเหนือข้อพับ และปรับความดันให้ได้ประมาณครึ่งของค่าความดัน systolic และ diastolic (ถ้าในผู้ใหญ่ ประมาณ 80 mmHg) นาน 5 นาที
3. ลดความดันลง แล้วสังเกตจุดเลือดออกบริเวณหน้าแขนใต้ข้อพับนับจำนวนจุดเลือดออกในบริเวณพื้นที่วงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว
4. รายงานผล

   Positive : มีจุดเลือดออก > 10 จุด

   Negative : มีจุดเลือดออก < 10 จุด

หมายเหตุ

1. การทดสอบ Tourniquet test ให้ผลบวก แสดงว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับหลอดเลือดหรือเกล็ดเลือดอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือร่วมกันทั้ง 2 อย่าง
2. การทดสอบ tourniquet test ไม่สามารถนำมาวินิจฉัยโรคใดโรคหนึ่งได้
3. Tourniquet test ให้ผลบวกในภาวะดังต่อไปนี้

   : Thrombocytopenia จากสาเหตุอะไรก็ได้ เช่น ไข้เลือดออก (acute hemorrhagic fever)

   : Platelet dysfunctions เช่นโรค von Willebrand disease, Bernard Soulier syndrome, Glanzman' s thrombastenia

: มีความผิดปกติของหลอดเลือด

: Interaction ระหว่างเกล็ดเลือดกับหลอดเลือดเสียไป

4. ภาวะหรือโรคที่ไม่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของกลไกการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจให้ผลบวกกับการทดสอบ tourniquet test เช่น

   : คนปกติ (โดยเฉพาะผู้หญิงที่มีอายุ > 40 ปี)

   : ไข้ดำแดง (Scarlet fever)

   : หัด (Measles)

   : ไข้หวัดใหญ่ (Influenza)

5. การทดสอบ tourniquet test ให้ผลบวก ไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับค่า Bleeding time เช่น โรคลักปิดลักเปิด (Scurvy) จ้ำเลือดออกเนื่องจากการแพ้ (Allergic purpura) และ Sepsis ซึ่ง tourniquet test ให้ผลบวก แต่ Bleeding time ปกติ
6. การทดสอบ tourniquet test ไม่ควรทำซ้ำในแขนข้างเดิมภายในหนึ่งสัปดาห์
7. ในเด็กเล็กจะใช้ความดันต่ำกว่า 80 mmHg.

Bleeding Time

หลักการ

เป็นการทดสอบคุณภาพของหลอดเลือดฝอยกับการทดสอบปริมาณและคุณภาพของเกล็ดเลือด โดยวิธี Ivy method เมื่อมีบาดแผลเกิดกับหลอดเลือดฝอย ทำให้เลือดออก หลอดเลือดจะลดการไหลเวียนเลือดที่ไปยังบริเวณบาดแผล โดยมีการหดตัว (vasoconstriction) และกระตุ้นให้เกล็ดเลือดมาเกาะกลุ่ม (Platelet aggregation) เกิดเป็นก้อนเกล็ดเลือด (Platelet plug) อุดบาดแผลให้เลือดหยุดไหล แล้วดูเวลาตั้งแต่เลือดเริ่มออกจนกระทั่งเลือดหยุดไหล

เครื่องมือ

เครื่องวัดความดันเลือด (Sphygmomanometer)

วัสดุอุปกรณ์

1. ใบมีดปลายแหลม เบอร์ 11 หรือ Blood lancet
2. นาฬิกาจับเวลา
3. กระดาษกรอง
4. สำลี

น้ำยาและสารเคมี

70% Ethyl alcohol

วิธีทำ

1. รัดต้นแขนบริเวณเหนือข้อศอกด้วยเครื่องวัดความดัน โดยให้ความดันคงที่ ที่ 40 mmHg.
2. ทำความสะอาดหน้าแขน ซึ่งต่ำจากข้อพับแขนประมาณ 2-3 mm. ด้วยสำลีชุบ 70% alcohol
3. ใช้ Blood lancet เจาะให้ได้บาดแผลลึกประมาณ 2-3 mm. ระวังอย่าให้ถูกหลอดเลือดดำ
4. จับเวลาทันทีที่เห็นเลือดซึมออกมา
5. ใช้กระดาษกรองซับหยดเลือดทุก 30 วินาที โดยระวังอย่าให้กระดาษกรองแตะถูกปากแผล เพราะจะทำให้ลิ่มเลือดที่เกาะติดบริเวณบาดแผลหลุด เปลี่ยนรอยซับเลือดทุกครั้งไปจนกว่าเลือดจะหยุดไหล คือซับแล้วไม่มีเลือดติดกระดาษกรองอีก
6. นับเวลาที่เลือดออกจนกระทั่งเลือดหยุด จากรอยซับบนกระดาษกรอง
7. เจาะเลือดอีก 1 บาดแผล แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย รายงานผลเป็นนาที

ค่าปกติ Bleeding time = 1 – 7 นาที

หมายเหตุ

1. Bleeding time นานกว่าปกติแสดงว่าหลอดเลือดฝอย หน้าที่และปริมาณของเกล็ดเลือดผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือผิดปกติร่วมกันทั้งหมด
2. จำนวนเกล็ดเลือดปกติ แต่ Bleeding time ได้ค่านานกว่าปกติ พบได้ใน Platelet dysfunction, von Willebrand’ s disease หรือหลอดเลือดผิดปกติ, Vitamin C deficiency หรือ Scurvy, ได้รับยาที่ Inhibit platelet function เช่น Aspirin, Dipyridamole
3. ในกรณีที่ผู้ป่วยมีเลือดหยุดช้า ให้ทำการทดสอบเพียง 20 นาที ถ้านานกว่านี้ให้รายงานว่ามากกว่า 20 นาที แล้วหยุดการทดสอบ ไม่ปล่อยให้เลือดหยุดไหลเอง เพราะจะทำให้ผู้ป่วยเสียเลือดมาก
4. แผลที่เจาะ ถ้าเจาะไม่ได้มาตรฐานที่กำหนดทำให้ค่า Bleeding time ผิดพลาดได้
5. อย่าให้กระดาษกรองเช็ดถูกบาดแผล เพราะจะทำให้ลิ่มเลือดหลุดออก ค่า Bleeding time จะนานขึ้น

6. ผู้ป่วยที่ได้รับยาที่มีฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) จะทำให้ค่า Bleeding time นานขึ้น เช่น aspirin ขนาดปกติ
7. ถ้าผู้ป่วยได้รับ aspirin ขนาดสูง ๆ พบว่า aspirin อาจจะไปยับยั้งการสร้าง prostacyclin ของผนังหลอดเลือด มีผลทำให้ค่า Bleeding time สั้นกว่าที่เป็นจริง
8. อารมณ์ของผู้ป่วย ถ้าตื่นเต้นมากจะได้ค่าที่ไม่ตรงกับความจริงหรือบางครั้งเลือดไม่ไหลออกมาเลย

Coagulation time

(Whole blood clotting time, Venous clotting time, VCT)

หลักการ

เป็นการทดสอบคร่าว ๆ (screening test) ว่ามีความบกพร่องของ Coagulation factor ตัวใดตัวหนึ่งใน intrinsic pathway หรือไม่ โดยเลือดที่เจาะ ออกมาจากหลอดเลือดดำ จะถูกกระตุ้นให้เกิดลิ่มเลือด โดย Surface activity ของหลอดทดลอง การเกิดลิ่มเลือดนี้เกิดโดยการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในส่วน intrinsic pathway

เครื่องมือ

Water bath 37^0C

วัสดุอุปกรณ์

1. Syringe ขนาด 5 ml.
2. Needle No. 21
3. Stop watch
4. หลอดแก้วขนาด 13 X 100 mm. 3 หลอด
5. สำลีก้อน
6. สายยางรัดแขน

น้ำยาและสารเคมี

70% ethyl alcohol

วิธีทำ

1. เขียนหมายเลขที่หลอดทดลอง เป็น 1, 2 และ 3
2. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำประมาณ 5 ml.

3. นำเลือดไปใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 1 ml. ถ้าเป็น Syringe แก้ว จะจับเวลาตั้งแต่เลือดเข้า Syringe แต่ถ้าเป็น Syringe พลาสติก จะจับเวลาตั้งแต่เลือดเข้าหลอดทดลองหลอดแรก
4. นำหลอดทดลองทั้ง 3 หลอด ไปอุ่นที่ 37^0C นาน 5 นาที แล้วจับเอียงหลอดที่ 1 ทุก 30 วินาที จนเลือดไม่ไหลออกจากหลอด แล้วจึงยกหลอดที่ 2 เอียงทุก 30 วินาที จน Clot แล้วยกหลอดที่ 3 เอียง ทุก 30 วินาที จน Clot
5. จับเวลาตั้งแต่ใส่เลือดลงในหลอดที่ 1 จนเลือดแข็งตัวในหลอดที่ 3 นับเป็นเวลาการแข็งตัวของเลือด

ค่าปกติ

VCT = 7 – 15 นาที

หมายเหตุ

1. ค่า VCT จะผิดปกติก็ต่อเมื่อ Coagulation factor มี activity < 5% ซึ่งแสดงว่ามีความผิดปกติอย่างรุนแรงเกิดขึ้น สำหรับผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเกล็ดเลือดทั้งทางปริมาณและคุณภาพจะไม่ทำให้ค่า VCT ผิดปกติ
2. การทดสอบ VCT ใช้เวลานานและ reproducibility ต่ำ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงใช้การทดสอบ APTT (Activated partial thromboplastin time) แทน
3. การทดสอบ VCT มีประโยชน์ในการควบคุม และติดตามผลการรักษาผู้ป่วยด้วย Heparin และดูความรุนแรงของผู้ป่วย ในรายที่ถูกงูพิษกัด เช่น งูแมวเซา งูเขียวหางไหม้ และงูกะปะ
4. การมี Prolonged VCT บ่งชี้ถึง
   - มี Deficiency ของ Coagulation factor ใด Factor หนึ่งใน Intrinsic coagulation pathway
   - มี Coagulation inhibitors หรือ Circulating anticoagulant (พบน้อย)
5. ถ้าเลือดไม่ Clot เลย พบได้ใน
   - Afibrinogenemia หรือ Hypofibrinogenemia
   - Circulating anticoagulant บางรายที่ titer สูงมาก ๆ
6. VCT ปกติ พบได้ใน Thrombocytopenia, Abnormal platelet function และ Mild coagulation defects
7. หลอดที่ใช้ในการทดสอบต้องเป็นหลอดแก้วขนาด 13 X 100 mm. ถ้าใช้หลอดขนาดใหญ่หรือเล็กเกินไปจะทำให้ค่ายาว หรือสั้นกว่าค่าจริงตามลำดับ

8. ปริมาณเลือดที่ใส่ในแต่ละหลอดต้องเท่ากับ 1 ml. ถ้าใส่มากหรือน้อย จะทำให้ค่ายาวหรือสั้นกว่าค่าจริงตามลำดับ
9. อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบต้องเท่ากับ 37^0C ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้ค่าสั้นหรือยาวกว่าค่าจริง ตามลำดับ
10. ความถี่ในการเอียงหลอด ควรห่าง 30 วินาที ถ้าเอียงบ่อยหรือ นานกว่า 30 วินาที จะทำให้ค่าสั้นหรือยาวกว่าค่าจริง ตามลำดับ
11. การเจาะเลือดต้องให้ไหลสะดวก ถ้าเลือดไหลไม่สะดวกหรือมีฟองอากาศ จะทำให้มี Tissue factor ปนออกมา ค่าจะสั้นกว่าค่าจริง
12. เมื่ออ่านผล VCT แล้ว ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นสามารถนำมาทดสอบ Test อื่น ได้ต่ออีกเช่น

    12.1 Clot retraction time (ค่าปกติการหดตัวของลิ่มเลือด = 1-2 ชั่วโมง)

    ซึ่ง None or Poor Clot retraction time พบได้ใน

    - Severe Thrombocytopenia (Plt. Count < 50,000 cells / cu.mm.)
    - Abnormal Platelet Function
    - Fibrinogen สูงมาก ๆ (Hyperfibrinogenemia)
    - Test tube ไม่สะอาด มีไขมันเกาะ

    12.2 Clot lysis time (ค่าปกติของการละลายของลิ่มเลือด > 24 ชั่วโมง) ถ้า clot lysis time ละลายก่อน 24 ชั่วโมง จะพบในภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของ Fibrinolytic activity

Clot Retraction time

หลักการ

เป็นการทดสอบการหดตัวของลิ่มเลือด ซึ่งเป็นการบอกจำนวนและหน้าที่ของเกล็ดเลือด เมื่อเลือดแข็งตัวแล้วจะเกิดการหดตัว โดย ATP ในเกล็ดเลือดซึ่งอยู่ภายในลิ่มเลือด จะสลายตัวเป็น ADP ทำให้โปรตีน Thrombasthenin ในเกล็ดเลือดหดตัว จึงทำให้ลิ่มเลือดหดตัวตามไปด้วย การหดตัวของลิ่มเลือดขึ้นอยู่กับปริมาณและคุณภาพของเกล็ดเลือด ไฟบริโนเจนและจำนวนเม็ดเลือดแดง

เครื่องมือ

Water bath

วัสดุอุปกรณ์

1. Rack
2. หลอดแก้ว ขนาด 13 X 100 mm.

3. Syringe ขนาด 3 ml.
4. เข็มเจาะเลือด No. 21
5. สำลีก้อน
6. สายยางรัดแขน
7. หมอนรองแขน

น้ำยาและสารเคมี

70% Ethyl alcohol

วิธีทำ

1. เจาะเลือด 1 ml. ใส่หลอดแก้วขนาด 13 X 100 mm. อุ่นใน Water bath ที่ 37^0C
2. เมื่อเลือดแข็งตัวแล้ว ให้เริ่มจับเวลาอาจใช้เลือดที่ได้จากการทดสอบการแข็งตัวของเลือด (venous clotting time)
3. สังเกตการณ์หดตัวของลิ่มเลือดที่ 1 และ 2 ชั่วโมง
4. การรายงานผล

Normal retraction	:	ลิ่มเลือดหดตัวสมบูรณ์เต็มที่ ภายในเวลา 2-4 ชั่วโมง (หดตัว 45-60% ของ Serum)
Poor retraction	:	ลิ่มเลือดหดตัวหลังจาก 4 ชั่วโมงและไม่เกิน 24 ชั่วโมง
No retraction	:	ลิ่มเลือดไม่หดตัวเลยหลังเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ

1. ลิ่มเลือดมีการหดตัวไม่ดี หรือหดตัวแล้วมีซีรั่มออกมาน้อยกว่าร้อยละ 20 หรือไม่มีการหดตัวพบในภาวะต่อไปนี้

   : Severe thrombocytopenia (Platelet <50,000 cells/cu.mm) หรือมีความผิดปกติในหน้าที่ของเกล็ดเลือด เช่น thrombasthenia

   : ภาวะไฟบริโนเจนต่ำ เช่น Hypofibrinogenemia, afibrinogenemia

   : ภาวะไฟบริโนเจนสูง (Hyperfibrinogenemia) จะทำให้ก้อนลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างไฟบรินที่แข็งแรงมาก ทำให้การหดตัวโดยขบวนการของเกล็ดเลือดทำได้ยากขึ้น
2. ค่า Clot retraction time จะเป็นสัดส่วนผกผันกับค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น คือ เมื่อมีเม็ดเลือดแดงน้อยหรือซีดจะมีการหดตัวของลิ่มเลือดเร็ว แต่ถ้ามีจำนวนเม็ดเลือดแดงมาก เช่น Polycythemia vera ลิ่มเลือดจะหดตัวได้น้อยและเม็ดเลือดแดงจะตกมาที่ก้นหลอด
3. ถ้าหลอดทดลองไม่สะอาดมีไขมันเกาะจะทำให้ลิ่มเลือดไม่หดตัว

4. การแปลผลการหดตัวของลิ่มเลือดสามารถตรวจหน้าที่ของเกล็ดเลือดได้ เมื่อในเลือดมีปริมาณเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดงและไฟบริโนเจนปกติ

Clot lysis time

หลักการ

เมื่อเลือดแข็งตัวหรือเกิด Fibrin clot แล้ว จะเกิดขบวนการละลายตัวของลิ่มเลือด โดยตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen activator) ในเลือด จะไปกระตุ้น Plasminogen ในลิ่มเลือดให้เปลี่ยนเป็น Plasmin ซึ่ง Plasmin ที่เกิดขึ้น จะไปละลายลิ่มเลือด เวลาจากการเกิด Clot retraction จนลิ่มเลือดละลาย คือ Clot lysis time

เครื่องมือ

Water bath

วัสดุอุปกรณ์

1. Rack
2. หลอดแก้ว ขนาด 13 X 100 mm.
3. Syringe ขนาด 3 ml.
4. เข็มเจาะเลือด No. 21
5. สำลีก้อน
6. สายยางรัดแขน
7. หมอนรองแขน

น้ำยาและสารเคมี

70% Ethyl alcohol

วิธีทำ

1. เจาะเลือด 1 ml. ใส่หลอดแก้วขนาด 13 X 100 mm. อุ่นใน Water bath ที่ 37^0C
2. เมื่อเลือดแข็งตัวและหดตัวแล้ว ให้เริ่มจับเวลาจนครบ 24 ชั่วโมง (หรืออาจใช้เลือดที่ได้จากการทดสอบ Venous clotting time และ Clot retraction time)
3. สังเกตการละลายของลิ่มเลือดเป็นระยะ ๆ ว่าเกิดการละลายของลิ่มเลือดเมื่อใด
4. การรายงานผล รายงานค่าเป็นชั่วโมง

ค่าปกติ

Clot lysis time : > 24 ชั่วโมง

หมายเหตุ

1. ถ้าลิ่มเลือดละลายเร็วกว่า 24 ชั่วโมง แสดงว่ามีตัวกระตุ้น Plasminogen หรือ Plasmin activity ในเลือดสูงกว่าปกติ
2. ภาวะที่มี Fibrinolytic activity สูงขึ้น พบได้ใน
   - มีการทำลายเซลล์ตับอย่างรุนแรงจากสาเหตุต่าง ๆ
   - หญิงตั้งครรภ์ ที่รกลอกตัวก่อนกำหนด (Aruptio placentae)
   - หลังได้รับการผ่าตัดบางชนิด เช่น Portocaval shunt การตัดต่อมธัยรอยด์ออก การผ่าตัดสมอง เป็นต้น
   - หลังหัวใจหยุดเต้น แล้วแก้ให้ฟื้นได้
   - ภายหลังจากฉีด Adrenalin
   - ปฏิกิริยาของสาร Pyrogen
3. ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบการแข็งตัวของเลือด (Coagulation defect) จะทำให้การแข็งตัวของเลือดไม่สมบูรณ์ (Inadequate clot) ทำให้อ่านผลผิดเป็น Increased fibrinolytic activity
4. พลาสมาที่มี Fibrinogen ต่ำ และมี Fibrin degradation products (FDP) สูง จะทำให้ก้อนเลือดที่แข็งตัวมีขนาดเล็กและมีลักษณะยุ่ย ทำให้เข้าใจผิดว่าลิ่มเลือดละลายแล้ว
5. ในภาวะที่ผู้ป่วยมี Severe fibrinolysis จนไม่มี Plasminogen ในเลือดเลย จะทำให้ลิ่มเลือดไม่ละลาย
6. ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะ Hyperfibrinolysis ร่วมกับมี Fibrinogen ในเลือดต่ำ ลิ่มเลือดจะละลายเร็วมาก อาจใช้เวลาเพียง 2-3 นาทีเท่านั้นก็เริ่มละลายแล้ว อาจทำให้เข้าใจผิดว่าเลือดไม่แข็งตัวเลย

บรรณานุกรม

1. ชวลิต กฤษเพชรรัตน์, Bleeding time, ใน: นันทรัตน์ โฆมานะสิน, ชวลิต กฤษ เพชรรัตน์, บรรณาธิการ, คู่มือการทดสอบกระบวนการห้ามเลือด, ขอนแก่น, ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2534, 11-15.
2. พรวรีย์ ลำเจียกเทศ, กฤษณา ปทีปโชติวงศ์, พรศรี ตันตินิติ, การตรวจการห้ามเลือดทางห้องปฏิบัติการ, ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540, 35-36.
3. สุคนธ์ วิสุทธิพันธ์, พรศรี ตันตินิติ, คู่มือปัญหาเลือดออกผิดปกติและการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2551, 35.

Laboratory 7.

Routine Urinalysis

ปฏิบัติการ

Urine examination

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. อธิบายวิธีการเก็บปัสสาวะได้อย่างถูกต้อง
2. ตรวจปัสสาวะทางกายภาพ ทางเคมี และวัดความถ่างจำเพาะของปัสสาวะได้
3. เตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ถูกต้อง
4. แยกและบอกชนิดของตะกอนที่พบในปัสสาวะได้
5. รายงานผลการตรวจปัสสาวะได้ถูกต้อง

วิธีการปฏิบัติ

1. ดู Demonstration

   การรายงานสีของปัสสาวะ

   การรายงานความขุ่นของปัสสาวะ

   การวัดความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity : Sp.gr) ด้วยเครื่อง Refractometer

   การตรวจทางเคมีด้วย reagent strip แบบต่าง ๆ

   การตรวจโปรตีนด้วยวิธี Robert' s test

   ตะกอนปัสสาวะที่พบในภาวะต่าง ๆ

   ตัวอย่างการรายงานผลการตรวจปัสสาวะ
2. ให้นิสิตเก็บปัสสาวะของตนเองมาประมาณ 20 ml. เพื่อทำ Urine examination พร้อมรายงานผล
3. ให้นิสิตตรวจปัสสาวะของผู้ป่วยที่เตรียมมาให้ 1 ตัวอย่าง/นิสิต 2 คน พร้อมรายงานผล

การตรวจปัสสาวะ

(Urine analysis : U/A, Urine examination)

การตรวจปัสสาวะในงานประจำวัน (Routine urinalysis) เป็นการตรวจเบื้องต้น (Screening test) เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคของระบบทางเดินปัสสาวะ โรคไต โรคเบาหวาน และโรคตับ ตลอดจนใช้ในการติดตามการรักษา ดูความรุนแรงของโรค และช่วยในการพยากรณ์โรค การตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ ประกอบด้วย 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

1. การตรวจทางกายภาพ (Physical examination) ได้แก่

1.1 การตรวจดูสีของปัสสาวะ (Color)

ปัสสาวะปกติจะมีสีแตกต่างกันตั้งแต่สีเหลืองอ่อน (pale yellow) จนถึงสีเหลืองอำพัน (dark amber) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสีเหลืองในปัสสาวะ สีปัสสาวะที่ผิดปกติขึ้นอยู่กับโรค พยาธิสภาพบางชนิด อาหารและยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไป

สีของปัสสาวะที่เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ

สี	สาเหตุ
Colorless	Very dilute urine
Milky	Many PMN (pyuria), chyluria, lipiduria
Yellow – orange	Bilirubin – biliverdin
Yellow – green	Bilirubin – biliverdin
Yellow – brown	Bilirubin – biliverdin
Red – brown	RBC, Hemoglobin on standing, methemoglobin, myoglobin
Brown – black	Methemoglobin
Blue - green	Methylene blue, Pseudomonas infection

1.2 การตรวจดูความขุ่น (Turbidity)

ความขุ่นของปัสสาวะเกิดจากมีเซลล์ ผลึก เชื้อแบคทีเรีย รา การรายงานความขุ่น ของปัสสาวะด้วยตาเปล่า นิยมรายงาน ดังนี้

ใส	: clear	→ ไม่พบ particle ใด ๆ ในปัสสาวะ
ขุ่นเล็กน้อย	: Slightly turbid	→ พบ particle เล็กน้อยเมื่อมองผ่านปัสสาวะเห็นตัวพิมพ์อักษรบนกระดาษไม่ชัด
ขุ่นมาก	: Turbid	→ พบ particle จำนวนมาก เมื่อมองผ่านปัสสาวะไม่เห็นตัวพิมพ์อักษรบนกระดาษ

1.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity :Sp.gr)

การวัดความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.) ของปัสสาวะเป็นการวัดปริมาณของสารที่ละลายอยู่ในปัสสาวะ คนปกติจะมีค่าตั้งแต่ 1.003 – 1.035 ความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะจะมีค่าเปลี่ยนแปลงตลอดวันขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำที่ดื่ม อาหาร อุณหภูมิ

2. การตรวจทางเคมี (Chemical examination)

ปัจจุบันการตรวจทางเคมีของปัสสาวะนิยมตรวจโดยใช้แถบทดสอบ (reagent strip) เป็นส่วนใหญ่ แถบทดสอบส่วนใหญ่ทำด้วย cellulose ตรงตำแหน่ง absorbent pad จะเคลือบด้วยสารเคมีที่ต้องการทดสอบ แถบทดสอบที่ใช้มีทั้งชนิดแถบเดี่ยว และหลายแถบซึ่งสามารถตรวจสารเคมีได้หลายชนิดในแถบเดียวกัน แถบทดสอบมีความไวและความจำเพาะต่อสารที่ต้องการตรวจ แต่ผู้ใช้ต้องศึกษาให้ละเอียดถึงหลักการ วิธีการใช้ ข้อควรระวังและปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทดสอบที่ทำให้เกิดผลบวกลวง (false positive) หรือผลลบลวง (false negative)

3. การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination)

การตรวจพบตะกอนปัสสาวะแต่ละชนิด เป็นสิ่งที่อาจช่วยบอกถึงตำแหน่งพยาธิสภาพของระบบปัสสาวะช่วยในการวินิจฉัยโรค หรือบ่งบอกว่าปัสสาวะที่ตรวจมีการปนเปื้อนได้ สิ่งต่าง ๆ ที่พบในปัสสาวะโดยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

3.1 เซลล์ (Cells)

3.2 คาสท์ (Cast)

เป็นโปรตีน (Tamm-Horsfall protein) ที่ตกตะกอนในท่อหลอดไตฝอย มีลักษณะเป็นแท่ง ถ้ามีส่วนของโปรตีนอย่างเดียว เรียก hyaline cast มีลักษณะเป็นแท่งใส ไม่มีสี แต่ถ้ามีเซลล์อื่น ๆ หรือสารต่าง ๆ เข้าไปร่วมในการเกิดคาสท์นั้น ๆ จะเรียกชื่อคาสท์ตามสารหรือเซลล์ที่อยู่ใน cast นั้น เช่น ถ้า renal epithelial cell ไปอยู่ในแท่งคาสท์ จะเรียกคาสท์นี้ว่า Epithelial cast โดยเซลล์ที่อยู่ในคาสท์ต้องมีมากกว่า 1/3 ของแท่งคาสท์นั้น การพบคาสท์แต่ละชนิดเกิดจากพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน

3.3 ผลึก (crystal)

3.4 เชื้อจุลชีพและปรสิต (Microorganisms and parasites)

3.5 Miscellaneous Formed Elements เช่น mucous thread, Spermatozoa เป็นต้น

การรายงานผลการตรวจตะกอนปัสสาวะทางกล้องจุลทรรศน์

การรายงานผลตะกอนปัสสาวะชนิดต่าง ๆ จำแนกได้เป็น 2 แบบ คือ

1. การรายงานผลเป็นช่วงตัวเลขต่อหน่วยพื้นที่
2. การรายงานผลเป็นระดับความมากน้อย

1. การรายงานผลเป็นช่วงตัวเลขต่อหน่วยพื้นที่

นิยมรายงานในตะกอนปัสสาวะที่มีความสำคัญในการช่วยวินิจฉัยโรค ช่วงตัวเลขที่นำมารายงาน ได้แก่ negative, rare, 0-1, 1-2, 2-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50,50-100 และ >100

1.1 รายงานเป็นช่วงตัวเลข / HPF (High power field : 40X) ได้แก่ WBC, RBC, Epithelial cell, Oval fat body, *Trichomonas vaginalis*

1.2 รายงานเป็นช่วงตัวเลข / LPF (Low power field : 10X) ได้แก่ cast การเลือกช่วงตัวเลขที่รายงาน ได้มาจากการนับจำนวนตะกอนปัสสาวะชนิดหนึ่ง ๆ ที่พบในแต่ละ field แล้วนับรวม 10 field นำไปหาค่าเฉลี่ยต่อ 1 field ถ้าค่าเฉลี่ยตกอยู่ในช่วงตัวเลขใด ให้รายงานเท่ากับช่วงตัวเลขนั้น ๆ ที่ใช้ตรวจดู

<u>ตัวอย่าง</u>

นับ WBC จำนวน 10 HPF ได้ 7, 8, 6, 6, 7, 8, 9, 8, 7, 6

$$\text{เฉลี่ย 1 field} = \frac{7+8+6+6+7+8+9+8+7+6}{10} = 72/10 = 7.2/\text{ HPF}$$

เพราะฉะนั้นรายงานจำนวน WBC = 5 – 10 /HPF

ซึ่งช่วงที่รายงานจะไม่ใช่ค่าที่ได้จากจำนวนสูงสุดหรือต่ำสุดของจำนวนตะกอนในปัสสาวะต่อ field แต่เป็นช่วงตัวเลขที่กำหนดใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของจำนวนตะกอนปัสสาวะ

2. การรายงานเป็นระดับความมากน้อย รายงานดังนี้

negative:	:	ไม่พบ
rare	:	พบน้อยกว่า 4 ells/slide
few	:	พบเล็กน้อย กระจายประปราย
moderate	:	พบกระจายปานกลาง บางครั้งจับกลุ่มเล็ก ๆ
many	:	พบกระจายมากขึ้น จับกลุ่มใหญ่ขึ้น
numerous	:	พบหนาทึบ บังตะกอนชนิดอื่น

ได้แก่ การายงาน : crystal, amorphous, mucous thread, spermatozoa, yeast, bacteria, fat globules

การตรวจปัสสาวะ

(Urinalysis)

สิ่งส่งตรวจ

ปัสสาวะนิยมเก็บโดยวิธี mid stream urine โดยการถ่ายปัสสาวะช่วงแรกทิ้งเล็กน้อย เก็บปัสสาวะช่วงกลางประมาณ 20-30 ml. ใส่ภาชนะเก็บปัสสาวะ แล้วปัสสาวะช่วงท้ายให้ทิ้งไป ควรตรวจภายใน 2 ชั่วโมง

เครื่องมือ

1. Centrifuge
2. กล้องจุลทรรศน์
3. Refractometer

วัสดุอุปกรณ์

1. ภาชนะเก็บปัสสาวะมีปากกว้าง สะอาด และแห้ง
2. Centrifuge tube
3. Pasteur pipette
4. Slide
5. Cover slide
6. Test tube ขนาด 12X75 mm.
7. ผ้ากอส

น้ำยาและสารเคมี

1. Reagent strip
2. Robert’ s reagent

วิธีทำ

1. การตรวจทางกายภาพ (Physical examination)

1.1 ตรวจดูสีของปัสสาวะ

1.2 ตรวจดูความขุ่นของปัสสาวะ

1.3 ตรวจวัดความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะ ทำการตรวจ ดังนี้

- ทำความสะอาด prism ของเครื่อง refractometer ให้แห้งด้วยผ้านุ่ม
- หยดน้ำกลั่นเข้าเครื่อง ปรับเครื่องให้เป็นศูนย์
- หยดปัสสาวะลงไป แล้วอ่านค่า
- ล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้งด้วยผ้านุ่ม

2. การตรวจทางเคมี (Chemical examination)

โดยการใช้แถบทดสอบ (reagent strip)

2.1 จุ่ม strip ลงในปัสสาวะให้ท่วมแถบทดสอบ แล้วรีบดึงขึ้นให้ปาดแถบทดสอบด้านข้างกันขอบปากภาชนะที่ปัสสาวะเพื่อขจัดปัสสาวะส่วนเกินออก ซึ่งจะลดการปนเปื้อนของสารเคมีจากแถบทดสอบที่อยู่ใกล้กัน ซึ่งอาจทำปฏิกิริยารบกวนกันได้

2.2 จับเวลาอ่านผลตามเวลาที่กำหนดของแต่ละการทดสอบ โดยการเทียบสีกับแถบสีมาตรฐานที่ปิดฉลากอยู่ด้านนอกภาชนะที่เก็บ reagent strip

2.3 รายงานผลเป็น negative หรือ positive โดยให้ระดับ positive เป็นบวก เช่น trace, 1+, 2+, 3+ และ 4+ เทียบกับแถบสีมาตรฐาน การตรวจโปรตีนโดยใช้ reagent strip จะให้ผลบวกเฉพาะ albumin เท่านั้น โปรตีนชนิดอื่น เช่น globulin, Bence Jones protein และ mucoprotein ไม่สามารถตรวจได้

3. การเตรียมตะกอนปัสสาวะ ปฏิบัติดังนี้

3.1 ผสมปัสสาวะให้เข้ากัน

3.2 เทปัสสาวะปริมาตร 10 ml. ใส่ในหลอดพลาสติกก้นแหลม (Centrifuge tube)

3.3 ปั่นในเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 1,500 – 2,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที รอให้เครื่องหยุดหมุนเอง

3.4 นำหลอดปัสสาวะออก และดูดส่วนใสทิ้ง ให้เหลือตะกอนปัสสาวะประมาณ 1 ml.

3.5 ผสมตะกอนปัสสาวะให้เข้ากัน โดยการเคาะก้นหลอดกับฝ่ามือหรือโต๊ะจนตะกอนกระจายตัวดี

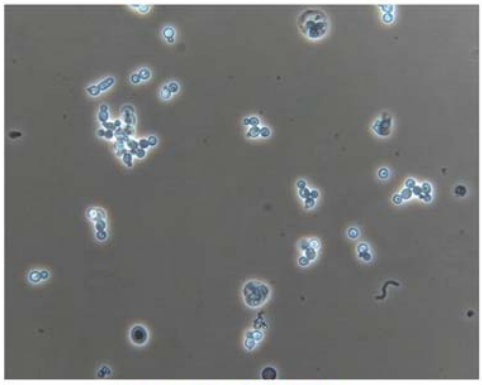
3.6 หยดตะกอนปัสสาวะ 1 หยด ลงบนสไลด์ที่สะอาด ปิดทับด้วย cover slide

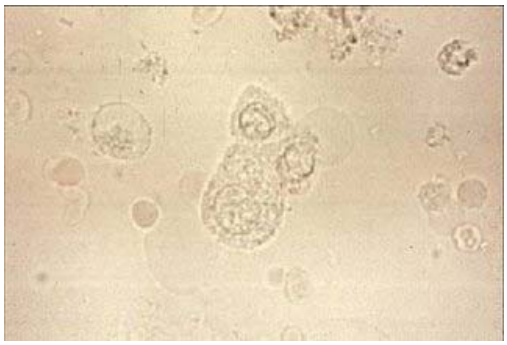
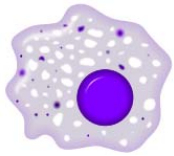
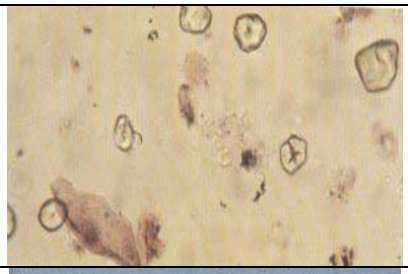
3.7 นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยเร็ว ก่อนที่ตะกอนจะแห้ง

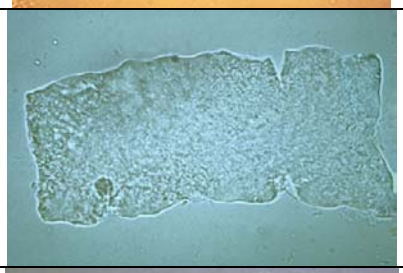
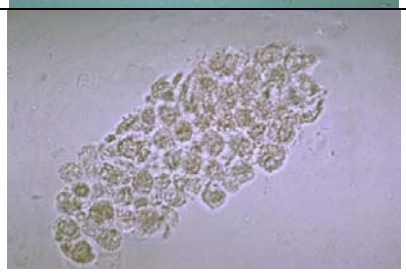
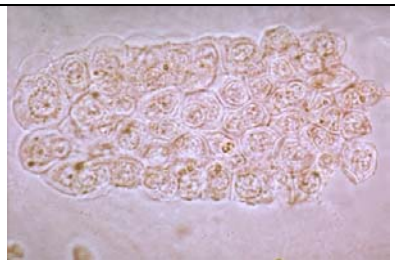
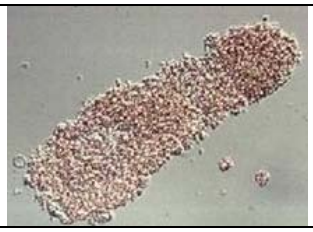
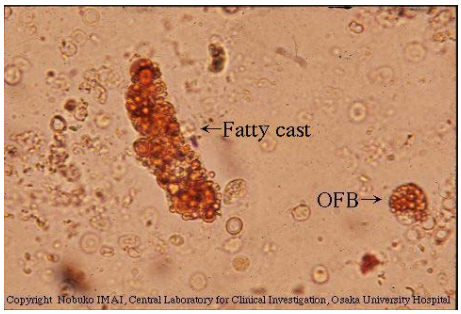
4. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

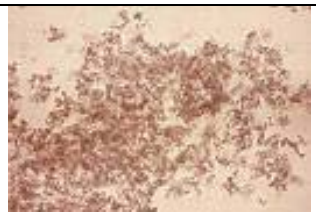
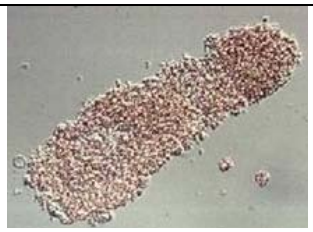
ใช้กำลังขยายต่ำ (Low power field : LPF : 10X) ตรวจดู cell และ cast ต่าง ๆ รวมทั้งการกระจายตัวของ cell หรี่ diaphram ให้แสงลดลงเพื่อจะตรวจดู hyaline cast ได้ ถ้าแสงสว่างมากเกินไปจะมองไม่เห็น hyaline cast ซึ่งเป็นแท่งบางใส เมื่อพบ cell หรือตะกอนต่าง ๆ ให้เลื่อนดูด้วยกำลังขยายสูง (High power field 40X) เพื่อจะได้ดูรายละเอียดของเซลล์ได้ชัดเจนมากขึ้น การรายงานผลให้ตรวจดูประมาณ 10 field แล้วเฉลี่ยต่อ 1 field ในกรณีที่รายงานต่อ HPF ต้องตรวจนับเซลล์ด้วย HPF 10 field แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อ 1 HPF ถ้ารายงานต่อ LPF ก็ต้องตรวจนับเซลล์ด้วย LPF 10 field แล้วหาค่าเฉลี่ยต่อ 1 LPF และรายงาน

การแยกตะกอนปัสสาวะที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

ลำดับ	ตะกอนปัสสาวะ	ลักษณะที่แตกต่างกัน	รูปร่างลักษณะ
1	RBC	สีทอง ไม่มี budding	
	Yeast cell	สีเขียว รูปรี มี budding	
2	WBC	Cytoplasm จะบาง ๆ Nucleus ขนาดเล็ก	

ลำดับ	ตะกอนปัสสาวะ	ลักษณะที่แตกต่างกัน	รูปร่างลักษณะ
2(ต่อ)	Renal epithelial cell	Cytoplasm หนา Nucleus ใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ลักษณะเซลล์เป็นเหลี่ยม (ยกเว้นเซลล์ที่ใกล้จะสลายจะไม่มีลักษณะเหล่านี้)	
3	Macrophage	ข้างในเซลล์สกปรก ไม่มีลักษณะวาว	
	Oval fat body	เป็น Renal epithelial cell ที่สลายและมีเม็ดไขมันกลมวาวหลายเม็ดขนาดต่าง ๆ อยู่ การตรวจโปรตีนต้องได้ผลบวก ประมาณ 2+ ถึง 3+	
4	เม็ดแป้ง (starch granule)	เซลล์ทึบ มีรอยแตกตรงกลาง ขอบไม่เรียบ	
	Fat globule	กลมวาวเรียบแบบลูกปิงปอง ไม่มีรอยแตก	

ลำดับ	ตะกอนปัสสาวะ	ลักษณะที่แตกต่างกัน	รูปร่างลักษณะ
5	Hyaline cast	แท่งโปร่งบางใส ไม่มีรอยแตกหัก	
	Waxy cast	แท่งทึบ เหมือนกระจกฟ้า เพราะเกิดจากเซลล์สลายตัวจนเป็นเนื้อเดียวกัน อาจพบรอยแตกหรือหัก	
6	WBC cast	เซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในแท่งคาสท์ จะมีรูปร่างกลมขนาดใกล้เคียงกัน cytoplasm บาง ๆ	
	Epithelial cell cast	Renal epitelial cell ที่อยู่ในคาสท์มีขนาดแตกต่างกันหลายแบบ บางครั้งกลม บางครั้งยืดยาวขึ้น	
7	Granular cast	แกรนูลจะไม่วาว ไม่มีรูปร่างลักษณะขรุขระ เพราะเกิดจากเซลล์สลาย คล้ายขยะ	
	Fatty cast	เม็ดไขมันจะกลมวาว ใหญ่กว่าแกรนูล	

ลำดับ	ตะกอนปัสสาวะ	ลักษณะที่แตกต่างกัน	รูปร่างลักษณะ
8	Mucous thread	เป็นเส้นใยเยื่อเมือก เป็นสายบาง ๆ ยาวเรียว	
	Cast	เป็นแท่งโปรตีนที่แข็งตัวในไต มีรูปร่างเป็นแท่งกระบอกตามรูปหลอดฝอยของไต มีขอบ 2 ข้างขนาน หัวท้ายอาจมนหรือตัด ขนาดเล็กหรือใหญ่ตามขนาดของหลอดฝอยของไตที่เป็นแม่พิมพ์ตรงส่วนที่เกิดคาสท์	
9	Amorphous	เป็นสารที่ไม่มีรูปร่าง ไม่พบขอบของคาสท์	
	Granular cast	พบขอบของแท่งคาสท์ pH เป็นกรด และการตรวจโปรตีนพบผลบวก	

Robert' s test

หลักการ

การตรวจหาโปรตีนในปัสสาวะ โดยกรดไนตริกจะตกตะกอนโปรตีนให้เกิดวงแหวนสีขาวขุ่น ความหนาของวงแหวนที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ วิธีนี้จะให้ผลบวกกับโปรตีนทุกชนิด

วิธีทดสอบ

1. เติมน้ำยา Robert ประมาณ 1 ml. ลงในหลอดแก้ว ขนาด 12X75 ml.
2. เอียงหลอดแก้วประมาณ 25 องศา เติมปัสสาวะให้ลอยอยู่เหนือชั้นของน้ำยาโดยให้ไหลลงตามผนังข้างหลอดแก้วทีละน้อยประมาณ 1 ml.

3. ทิ้งไว้ 2 นาที อ่านผลโดยดูตรงรอยต่อระหว่างน้ำยากับปัสสาวะ อาจใช้พื้นหลังสีดำเพื่อให้เห็นวงแหวนชัดเจนขึ้น

การรายงานผล

Negative	:	ไม่มีตะกอนสีขาวขุ่นตรงรอยต่อ
Trace	:	เกิดวงแหวนสีขาวขุ่นเห็นลาง ๆ เมื่อใช้พื้นหลังสีดำช่วย
1+	:	เกิดวงแหวนสีขาวขุ่น เห็นชัดหนาประมาณ 0.5 mm.
2+	:	เกิดวงแหวนสีขาวขุ่น เห็นชัดหนาประมาณ 1.0 mm.
3+	:	เกิดวงแหวนสีขาวขุ่น เห็นชัดหนาประมาณ 1.5 mm. และเมื่อมองจากปากหลอดแก้วลงไปจะเห็นความขุ่น
4+	:	เกิดวงแหวนสีขาวหนาทึบมากที่สุดและมีคราบตะกอนสีขาวติดข้างหลอดแก้ว

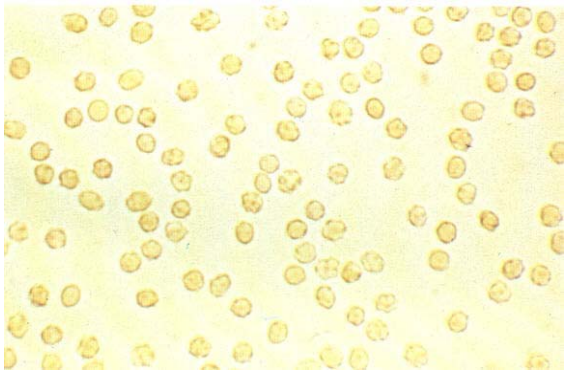
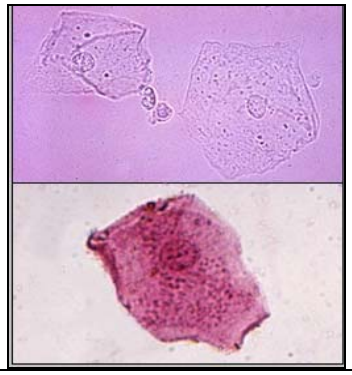
ค่าปกติของตะกอนปัสสาวะ

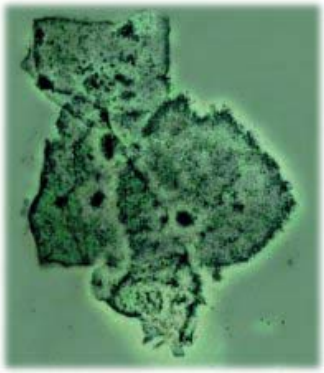
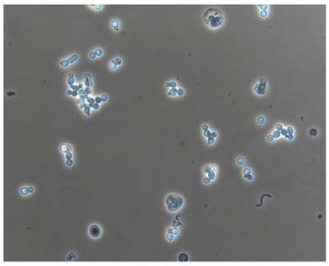
ตะกอนปัสสาวะ	ค่าปกติ (HPF=40x, LPF=10x)
Red blood cell (RBC)	0 – 2 / HPF
White blood cell (WBC)	0 – 6 / HPF
Renal epithelial cell	0 – 5 / HPF
Transitional epithelial cell	0 – 5 / HPF
Hyaline cast	0 – 2 / LPF
Granular cast	0 – 1 / LPF
Crystal	ไม่พบผลึกผิดปกติ
Bacteria	ไม่พบ
Parasite, fungus	ไม่พบ

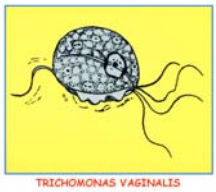
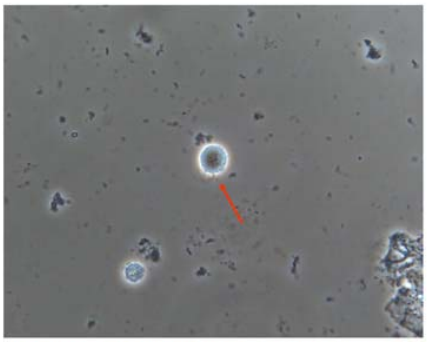
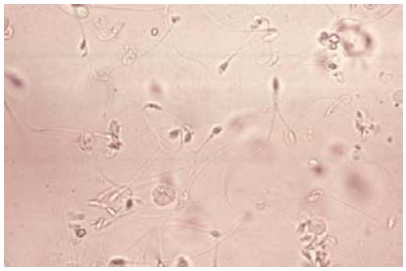
หมายเหตุ

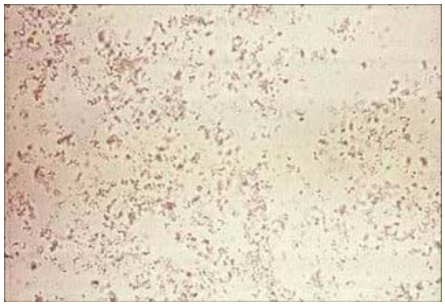
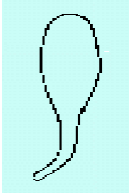
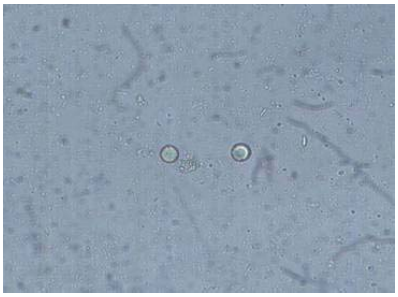
1. Reagent strip เมื่อใช้แล้วต้องปิดฝาให้สนิท เพื่อป้องกันความชื้น
2. ระวังอย่าให้มือไปสัมผัสถูกบริเวณแถบทดสอบ

Urine Sediment

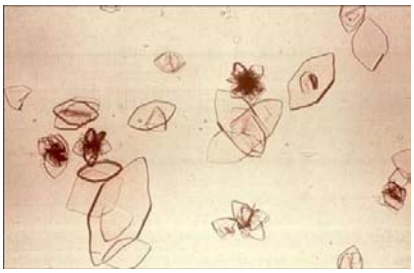
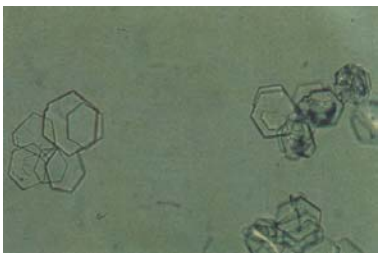
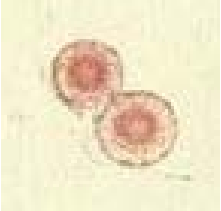
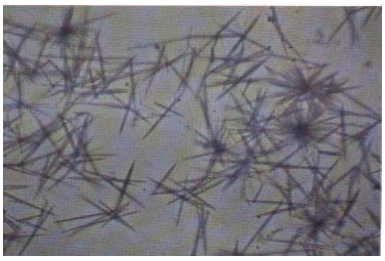
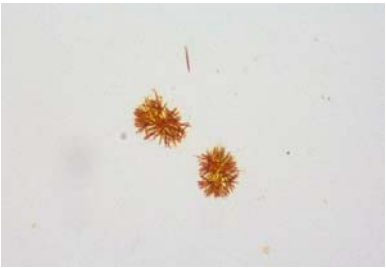
Cells	Description
Red Blood Cell 	a. Normal : รูปกลม ขอบเรียบ คล้ายขนมโดนัท สีทอง ไม่มีนิวเคลียส b. Crenated : เซลล์เหี่ยว ขอบหยักพบจุดกลม ๆ รอบเซลล์ c. Swollen : เซลล์บวมพอง d. Ghost cell : ไม่มี Hb. มีแต่ขอบเซลล์ e. Dysmorphic : ขนาดไม่แน่นอน รูปร่างบิดเบี้ยว
White Blood Cell	a. Normal : ใหญ่กว่า RBC อาจเห็นหรือไม่เห็นนิวเคลียส มีแกรนูล b. Glitter cell : ขนาดใหญ่กว่า WBC ธรรมดา มีแกรนูลเต้นระยิบระยับ c. Macrophage : เป็น Monocyte ขนาดใหญ่กว่า WBC ธรรมดา กินสิ่งต่าง ๆ เข้าไป ดูสกปรก
Squamous epithelial Cell 	เซลล์ใหญ่แบน รูปเหลี่ยม นิวเคลียสกลมหรือรูปไข่ขนาดเท่ากับ WBC มี Cytoplasm มาก ออกมาจาก urethra หรือ vagina
Transitional epithelial cell (Urothelial cell)	เซลล์มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่าเป็น bladder หรือ caudate epi. cell

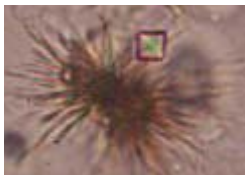
Renal epithelial cell	เซลล์รูปร่างกลมหรือหลายเหลี่ยม ขนาดใหญ่กว่า WBC เล็กน้อย นิวเคลียสใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มี Cytoplasm น้อยที่สุด เป็น epi.cell ที่มีขนาดเล็กที่สุดมาจากหลอดเลือดฝอยของไต
Clue cell 	Squamous epithelial cell ที่มีแบคทีเรีย (coccobacilli) ฝังอยู่รอบ ๆ ขอบเซลล์จำนวนมาก มีการติดเชื้อบริเวณท่อปัสสาวะหรือช่องคลอด
Oval fat body	Renal epithelial cell ที่เกิด fat degenerate มีเม็ดไขมัน กลมวาวสะท้อนแสงขนาดต่าง ๆ ฝังอยู่ <u>ต้องพบโปรตีนในปัสสาวะเสมอ</u>
Bacteria	a. Cocci รูปกลม อาจอยู่เดี่ยว คู่ หรือเป็นกลุ่ม b. Rods รูปแท่ง c. Spiral รูปเกลียว
a. Yeast cell b. Budding yeast 	a. Yeast cell รูปรี กลม cytoplasm ทึบกว่า RBC b. Budding yeast เป็น yeast ที่แตกหน่อ

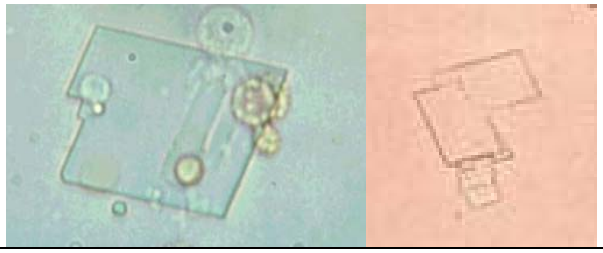
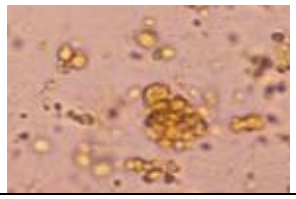
c. Pseudohyphae	c. Budding yeast cell ที่ยืดยาวออกไปคล้ายไม้แร็กเก็ตเป็นสายราเทียม แสดงว่า ลุกลามเข้าเนื้อเยื่อแล้ว
Trichomonas vaginalis   PROTOZOA: TRICHOMONAS VAGINALIS	รูปร่างเหมือนลูกแพร์ ขนาดใหญ่กว่า WBC เล็กน้อย เคลื่อนไหวโดยใช้ Flagella ทำให้ตกขาว คัน
Spermatozoa 	ตัวอสุจิ อาจพบเคลื่อนไหวหรือไม่เคลื่อนไหว ถ้าพบต้องรายงาน เพราะน้ำอสุจิทำให้การทดสอบโปรตีนได้ผลบวก

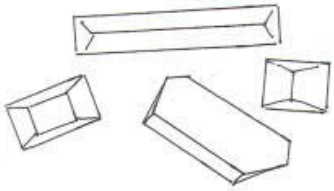
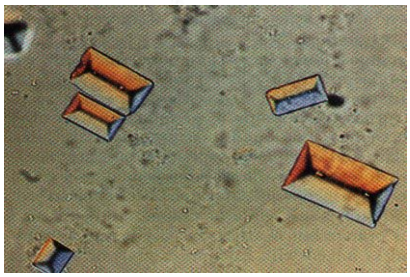
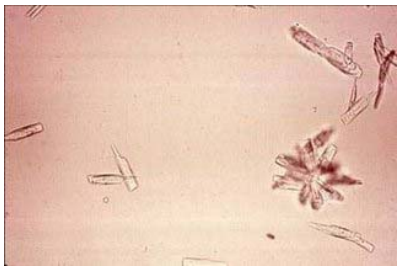
Miscellaneous	**Description**
Amorphous 	เป็นตะกอนของสาร มีลักษณะเป็นแกรนูลเม็ดเล็ก เป็นผง ไม่มีรูปร่าง อยู่กระจัดกระจายหรืออาจเป็นกลุ่มก้อน
Mucous thread	เส้นใยเยื่อเมือก เป็นสายบาง ๆ ยาว เรียงเป็นริบบิน
Cylindroid 	เป็นแท่งโปรตีน ที่มีปลายข้างหนึ่งมนคล้ายคาสท์ แต่ปลายอีกข้างหนึ่งเรียกเล็กเป็นหางยาว
Fat globule 	เม็ดไขมัน กลม วาวนูน อยู่เป็นอิสระนอกเซลล์ ต้องตรวจพบโปรตีนในปัสสาวะ ถ้าไม่พบแสดงว่าปนเปื้อนมา

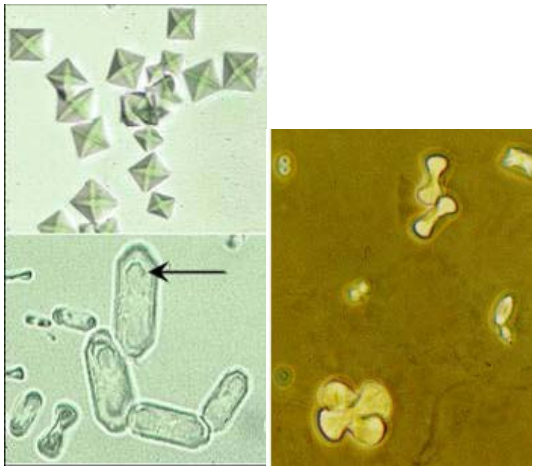
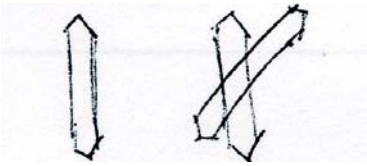
Crystal

Acid urine (pH = 5, 6)	
Uric acid 	แผ่นสี่เหลี่ยมรูปขนมเปียกปูนหรือแผ่นหกเหลี่ยมยาวมากกว่ากว้าง สีเหลืองน้ำตาลใส ถ้าผลึกหนาอยู่รวมกันเป็นกลุ่มอาจคล้ายดอกกุหลาบ ถังเบียร์ ถ้าผลึกบางจะไม่มีสี
Cystine 	หกเหลี่ยมด้านเท่าแบน ไม่มีสี พบเมื่อมีความผิดปกติของ metabolism มาแต่กำเนิด
Leucine 	กลมสีเหลือง มีรอยแตกเป็นรัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง เส้นรอบวงมีสองขอบซ้อนห่างกันชัดเจน ต่างจากเม็ดแป้ง พบในโรคตับ
Tyrosine 	รูปเข็ม เรียว เล็ก ยาว แหลมคมหัวท้าย สีเหลือง หรือไม่มีสี อาจซ้อนทับกันคล้ายดอกกุหลาบ พบในโรคตับ มักพบร่วมกับ Leucine
Bilirubin 	แผ่นรูปขนมเปียกปูน หรือสี่เหลี่ยมด้านเท่า รูปเข็ม หัวท้ายแหลม แท่งอ้วนสั้น สีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง

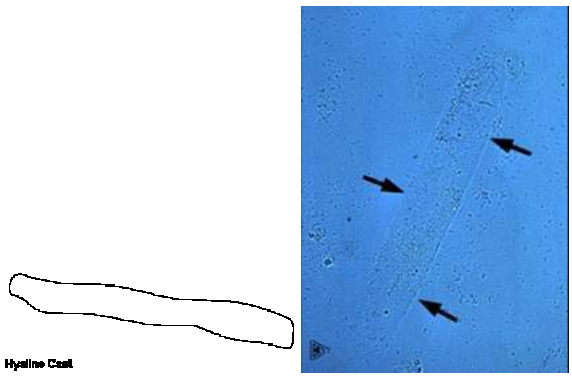
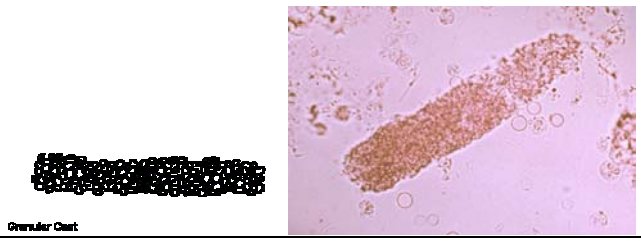
Potassium urate	รูปร่างเหมือน Ammonium urate กลมเล็ก สีน้ำตาล
Sodium urate 	แท่งผอมบาง คล้ายไม้บรรทัด มักอยู่เป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวเป็นรูปพัด ไม่มีสี หรือสีออกเหลืองควรแยกออกจากผลึกของซัลฟา

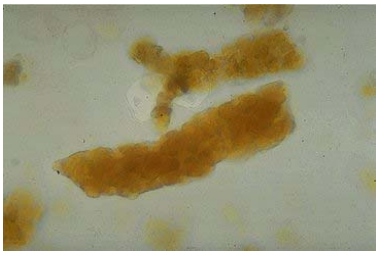
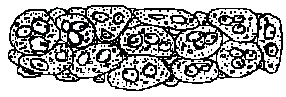
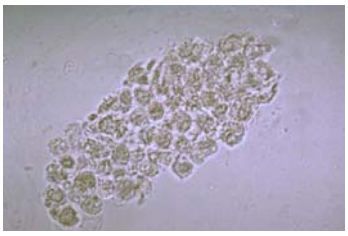
Acid or Neutral urine(pH = 5, 6, 7)	
Cholesterol 	แผ่นสี่เหลี่ยมมุมฉาก ใหญ่ มุมหักอย่างน้อยหนึ่งมุม
Hemosiderin 	แกรนูลเกาะอยู่กับ renal epi. cell หรืออยู่เป็นอิสระเม็ดสีน้ำตาลหรือเหลือง
Sulfonamide	ฟ่อนหญ้ามัดหัวหรือท้ายหรือตรงกลาง

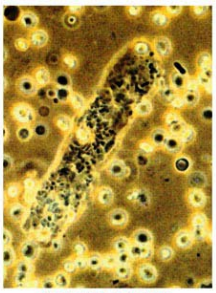
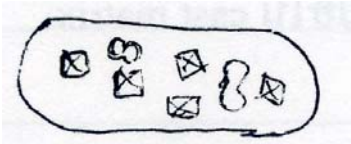
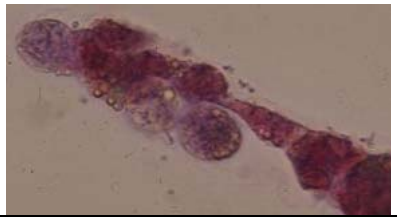
Neutral or Alkaline urine(pH – 7, 8)	
Calcium carbonate	รูป dumbell คล้ายดอกไม้ 4 กลีบ
Triple phosphate  	ผลึกรูปปริซึม 3-6 ด้าน รูปใบเฟิร์น, ฝาโลงศพฝรั่ง หรือรูปดาว
Ammonium biurate	กลม มีหนาม คล้ายหัวแห้ว สีน้ำตาล
Calcium phosphate 	แผ่นแบนใหญ่ มีแกรนูลอยู่ภายใน

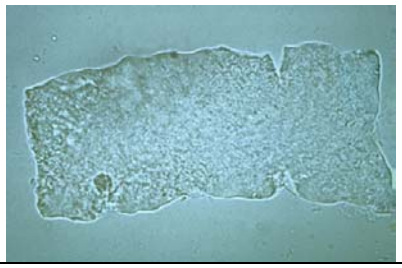
Acid Neutral or Slightly Alkaline urine (pH 5, 6, 7, 8)	
Calcium oxalate 	รูปซองจดหมาย วงแหวน รูปไข่ รูป dumbell หรือรูปแปรง
Hippuric acid 	แผ่นยาว 6 เหลี่ยม ยาวกว่า uric acid บางครั้งอาจเป็นปริซึม

Urine Sediment

Cast	Description
Hyaline cast 	คาสท์ที่เป็นแท่งโปรตีน รูปทรงกระบอก หัวท้ายมนโปร่งใส ไม่มีสีเนื้อเรียบ
Granular cast 	คาสท์ที่มีแกรนูลฝังอยู่ แกรนูลนี้เกิดจากเซลล์ต่าง ๆ สลายตัวไป

RBC cast	คาสท์ที่มี RBC กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอใน cast matrix
Hemoglobin cast 	คาสท์ที่เกิดจาก RBC สลายตัวพบสีส้มปนแดงของฮีโมโกลบินอยู่ใน protine matrix
WBC cast  	คาสท์ที่เกิดจาก WBC ฝังอยู่ ขนาดของ WBC จะใกล้เคียงกัน ขนาดกลมเล็กกว่า Renal epithelial cell
Epithelial cell cast	คาสท์ที่มี Renal epithelial cell ฝังอยู่ แยกจาก WBC cast โดย Renal epi. Cell จะมีขนาดใหญ่กว่า WBC นิวเคลียสเกือบเต็ม cell เซลล์มีขนาดต่าง ๆ กันขอบเซลล์ชัด

Cast	Description
Degenerating cellular cast	คาสท์ที่ประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่สลาย ซึ่งไม่สามารถจะบอกชนิดของเซลล์ได้
Bacterial cast 	คลาสท์ที่มี Bacteria ฝังอยู่จะเป็นจุดเนียน ๆ สีเขียว ไม่ขรุขระเหมือน granular cast
Mixed cast	คาสท์ที่มีเซลล์ต่าง ๆ หลายชนิด ฝังอยู่ในคาสท์เดียวกัน เช่น Mixed RBC, WBC cast
Crystal cast 	คาสท์ที่มีผลึกฝังอยู่
Oval fat body cast 	คาสท์ที่มี oval fat body ฝังอยู่

Cast	Description
Fatty cast	คาสท์ที่มีเม็ดไขมันกลมวาว ขนาดต่าง ๆ กันฝังอยู่ เกิดจาก Oval fat body แตกสลายตัวเป็นเม็ดไขมันขนาดต่าง ๆ กัน
Waxy cast 	คาสท์ที่เกิดจากเซลล์ต่าง ๆ สลายตัวจนเป็นเนื้อเดียวกัน จะมีลักษณะทึบ มักมีรอยแตกหรือหัก หยักเหมือนไส้หมู
Broad cast	คาสท์ที่มีขนาดใหญ่มีความกว้างมากกว่า 4 เท่าของ WBC หรือมากกว่า 8 เท่าของ RBC เรียกชื่อตามชนิดของเซลล์ที่ฝังอยู่ เช่น broad waxy cast

ตัวอย่างใบรายงานผลการตรวจปัสสาวะ

BUDDHACHINARAJ HOSPITAL PHITSANULOK	CLINICAL MICROSCOPY	DATE
		NAME
DIAGNOSIS	COLLECTION TIME	AGE
		WARD
REQUESTED BY	RECEIVED BY TIME	HN
		CLINICIAN
	PRIV. ADMIT OPD	

FECAL EXAMINATION

Appearance…….. color……..
Mucous……Blood…….
WBC/HPF……RBC/HPF……..
Parasite……
Other……
……
Occult blood……
CSF Other……..
Color……..Turbidity…….
WBC…….cells/cu.mm. RBC……cells/cu.mm.
DIFFERENTIAL
Neutrophil……..% Lymphocyte……..%
Eosinophil……...% Monocyte……..%
Other……
……
SEMEN ANALYSIS
Sperm count (60-150)……..million/ml.
Liquefaction……..min. Volume…….ml. pH…….
Motility……% Active progressive motility……%
Normal morphology….....%
WBC / HPF……..RBC / HPF……
Other……

ROUTINE URINALYSIS

Color……..Transp……..
Sp.gr……pH……
Albumin……Glucose……..
WBC / HPF……..RBC / HPF……
Squamous epithelial cells / HPF……..
Trans, epithelial cells / HPF……
Cast / LPF……
……..
Crystal……..
Mucous thread……..
Bacteria……
Other……
Bile……
Urobilinogen……..
Ketone……
Hemosiderin……..
Bence Jones protein……..
Pregnancy test.. ……
Urine-Morphine……
Other……..
……
Reported by……..……/……/……

Laboratory 8.

Special Laboratory

ปฏิบัติการ

Body fluid examination

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. อธิบายหลักการเก็บตัวอย่างและนำส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อการตรวจวิเคราะห์สารน้ำในร่างกายได้อย่างถูกต้อง
2. ตรวจและแปลผลการตรวจสารน้ำในร่างกายได้อย่างถูกต้อง

วิธีการปฏิบัติ

1. ดู Demonstration
   - การรายงานลักษณะทางกายภาพของ CSF และ effusion เช่น สี และความขุ่น
   - การตรวจลักษณะของ effusion ทางกายภาพ เพื่อแยกว่าเป็น transudate หรือ exudate
   - ตัวอย่าง CSF ที่เกิดการ trauma ขณะเจาะ
   - การเตรียมเซลล์โดยวิธีการตกตะกอน (Sedimentation)
   - เซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่พบใน body fluid ทางกล้องจุลทรรศน์
2. นิสิตนำ Body fluid ที่เตรียมไว้ให้จำนวน 1 ตัวอย่าง / นิสิต 2 คน เพื่อนำไป
   - ตรวจลักษณะทางกายภาพ เช่น สี และความขุ่น พร้อมรายงานผล
   - ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวด้วย counting chamber พร้อมรายงานผล
   - ปั่น Body fluid แล้วนำตะกอนไปย้อมสี Wright' s stain
   - ตรวจนับแยกชนิดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมรายงานผล
3. นิสิตนำสเมียร์ของ Body fluid ที่แจกให้ จำนวน 1 ตัวอย่าง/นิสิต 1 คนเพื่อนำไปตรวจนับแยกชนิดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมรายงานผล

Cell count and differential count

เครื่องมือ

1. Centrifuge
2. กล้องจุลทรรศน์

วัสดุอุปกรณ์

1. Counting chamber
2. Cover chamber
3. WBC pipette
4. Tuberculin syringe
5. Slide
6. ไฟแช็คหรือไม้ขีดไฟ
7. Syring ball
8. ผ้ากอส
9. ถาดย้อมสี
10. Test tube ขนาด 13 X 100 mm.
11. Plain capillary tube

น้ำยาและสารเคมี

1. 0.85% Normal saline solution
2. 3% glacial acetic acid
3. Absolute methanol
4. สี Wright' s stain
5. น้ำกลั่น

วิธีทำ

1. การตรวจ CSF (CSF examination)

ควรทำการตรวจภายใน 1 ชั่วโมง ตามขั้นตอนดังนี้

1.1 การตรวจทางกายภาพ (Physical examination)

เป็นการกรวดน้ำไขสันหลังด้วยตาเปล่า โดยดูลักษณะทั่วไป สังเกตสี ความขุ่น และการแข็งตัว ปกติน้ำไขสันหลังจะใส ไม่มีสี ตั้งทิ้งไว้จะไม่แข็งตัว ถ้ามีความผิดปกติบางอย่างเกิดขึ้น ลักษณะของน้ำไขสันหลังจะเปลี่ยนไป

การรายงาน

1. สี (color) : Colorless, Xanthochromia, red การรายงานสีถ้ามี RBC ปนให้ปั่น CSF แล้วรายงานสีหลังจากปั่นด้วย
2. ความขุ่น (Turbidity) : clear, turbid, cloudy

1.2 การตรวจนับเซลล์

ควรทำทันทีหลังเจาะ ไม่ควรทิ้งไว้นานเกิน 1 ชั่วโมง เซลล์ในน้ำไขสันหลังจะแตกสลายได้ง่าย การตรวจนับเซลล์ให้นับทั้งเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว โดยนับแยกกัน ถ้าเซลล์มีปริมาณมากการตรวจนับอาจต้องเจือจางตามความเหมาะสม ดังนี้

1.2.1 ถ้าน้ำไขสันหลังใสหรือขุ่นเล็กน้อย ไม่ต้องเจือจาง ผสมน้ำไขสันหลังให้เข้ากัน หยดลงใน counting chamber ทำการนับทั้ง 9 ช่องใหญ่ ปริมาตร = 1X1X0.1X9 = 0.9 cu.mm.

วิธีการคำนวณ

ปริมาตร 0.9 cu.mm. นับ WBC ได้ = N cells

ปริมาตร 1 cu.mm. นับ WBC ได้ $= \frac{N \times 1}{0.9}$ cells

∴ จำนวน WBC $= \frac{N}{0.9}$ cells/cu.mm.

สรุปสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์} = \frac{N}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ}} \text{ cells/cu.mm.}$$

ถ้านับ 9 ช่องใหญ่ ; จำนวนเซลล์ $= \frac{N}{0.9}$ cells/cu.mm.

ถ้านับ 4 ช่องใหญ่ ; จำนวนเซลล์ $= \frac{N}{0.4}$ cells/cu.mm.

1.2.2 กรณีที่น้ำไขสันหลังขุ่น ให้เจือจางด้วย 0.85% NSS เพื่อที่จะนับได้ทั้ง RBC และ Nucleated cell การเจือจางให้เจือจางตามความเหมาะสม ซึ่งอาจเจือจางใน WBC pipette 10 เท่า (ดูด CSF ถึงขีด 1.0 ดูดน้ำยาถึงขีด 11) หรือเจือจาง 20 เท่า (ดูด CSF ถึงขีด 0.5 ดูดน้ำยาถึงขีด 11) แล้วทำการนับแยกเซลล์เม็ดเลือดแดงกับเซลล์ที่มีนิวเคลียสตามความเหมาะสม ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก ควรนับเซลล์ที่มีจำนวนมากในช่องที่ตารางละเอียด เช่น ช่อง R จะได้ไม่นับซ้ำ การเลือกนับช่องใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของจำนวนเซลล์ ถ้าเซลล์มีจำนวนน้อยควรนับทั้ง 9 ช่องใหญ่ ถ้าเซลล์มีจำนวนมาก ควรนับ 5 ช่อง R การนับเม็ดเลือดแดงกับเซลล์ที่มีนิวเคลียส อาจนับไปพร้อม ๆ กัน หรือนับทีละครั้ง ตามความสะดวกและปริมาตรที่ใช้นับ โดยเม็ดเลือดแดงจะไม่มีนิวเคลียส มีสีของฮีโมโกลบินเป็นสีทอง อาจพบเม็ดเลือดแดงที่เหี่ยว มีหนาม (crenated RBC) หรือพบ ghost cell ซึ่งฮีโมโกลบินหลุดออกไปแล้ว ส่วนเม็ดเลือดขาวจะมีนิวเคลียสเซลล์จะทึบ มีสีเขียว ส่วนเซลล์อื่นที่มีขนาดใหญ่ และมีนิวเคลียสจะนับรวมกับเม็ดเลือดขาว การรายงานจะใช้ว่า nucleated cell (เซลล์ที่มีนิวเคลียส)

วิธีการคำนวณ

$$\text{จำนวนเซลล์ (cells/cu.mm.)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ X dilution factor}}{\text{ปริมาตรที่ใช้นับ}}$$

ตัวอย่างการคำนวณจำนวนเซลล์ (cells/cu.mm.)

นับ 1 ช่อง R (ปริมาตร = 0.2X0.2X0.1 = 0.004) $= \frac{\text{N X dilution factor}}{0.004}$

นับ 5 ช่อง R (ปริมาตร = 0.2X0.2X0.1X5 = 0.02) $= \frac{\text{N X dilution factor}}{0.02}$

นับ 25 ช่อง R หรือ 1 ช่อง W (ปริมาตร = 0.2X0.2X0.1X25 = 0.1) $= \frac{\text{N X dilution facotr}}{0.1}$

นับ 4 ช่อง W (ปริมาตร = 1X1X0.1X4 = 0.4) $= \frac{\text{N X dilution factor}}{0.4}$

นับ 9 ช่อง W (ปริมาตร = 1X1X0.1X9 = 0.9) $= \frac{\text{N X dilution facotr}}{0.9}$

1.3 การเตรียมสเมียร์และการย้อมสเมียร์ ทำดังนี้คือ

1.3.1 ผสมน้ำไขสันหลังให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองให้มากที่สุดเท่าที่มี

1.3.2 ปั่นด้วยความเร็ว 700-1,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

1.3.3 เทส่วนใสด้านบนทิ้ง

1.3.4 เคาะตะกอนที่ติดอยู่ก้นหลอดให้เข้ากัน

1.3.5 เทตะกอนลงบนแผ่นสไลด์แล้วใช้ปากหลอดเกลี่ยให้เป็นรูปวงรี แล้ว fix ทันทีขณะที่สเมียร์ยังไม่แห้งด้วยความร้อนอ่อน ๆ โดยผ่านเปลวไฟไปมา แล้ว fix ซ้ำด้วย absolute methanol

1.3.6 เจือจางสี Wright' stain 3 ส่วน (สี 1 ส่วน : น้ำกลั่น 2 ส่วน) ในหลอดทดลองและเทสีที่เจือจางแล้วลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ 3 นาที

1.3.7 ล้างด้วยน้ำประปา แล้วเช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.4 การตรวจสเมียร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.4.1 ตรวจดูสเมียร์ด้วยกำลังขยายต่ำ (10X) และกำลังขยายสูง (40X) ให้ทั่ว เพื่อดูการกระจายของเซลล์ ชนิดของเซลล์ที่พบ ลักษณะผิดปกติอื่น ๆ ที่อาจตรวจพบ รวมทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา เป็นต้น

1.4.2 เปลี่ยนกำลังขยายเป็น 100X และทำ differential cell count โดยนับแยกชนิดของเซลล์ที่พบ 100 เซลล์ และรายงานเซลล์แต่ละชนิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยรวมเซลล์ที่เป็น hematopoietic cell และ nonhematopoietic cell อยู่ใน 100 เซลล์ ถ้าเซลล์มีจำนวนน้อย ให้นับเซลล์ที่มีอยู่เท่าที่นับได้และรายงานเป็นจำนวนเซลล์

1.4.3 รายงานสิ่งผิดปกติอื่น ๆ ที่พบ เช่นเชื้อรา แบคทีเรีย abnormal cell ลักษณะต่าง ๆ ที่พบ

1.4.4 การตรวจดูเซลล์ควรตรวจดูเซลล์บริเวณบาง ๆ ประกอบด้วย เพราะถ้าตรวจบริเวณหนาเกินไป เซลล์ neutrophil จะหดทำให้ดูคล้าย lymphocyte จึงต้องดูลักษณะ lobe ประกอบด้วยทุกครั้ง

ค่าปกติของการนับแยกเม็ดเลือดขาว (CSF เตรียมสเมียร์โดยวิธี cytocentrifugation)

	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Neutrophil (%)
เด็กแรกเกิด (0-2 เดือน)	5– 35	50 – 90	0 – 8
ผู้ใหญ่ (อายุ >18 ปี)	40 - 80	15 -45	0 - 6

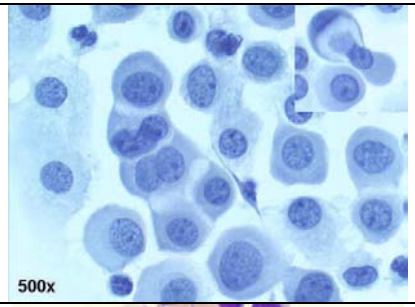
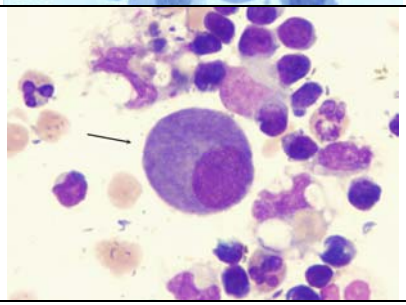
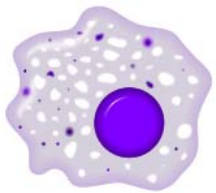
2. การตรวจ effusion

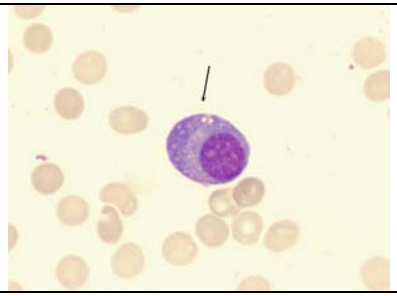
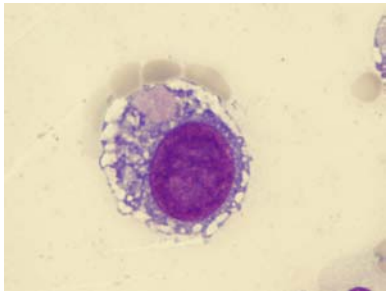
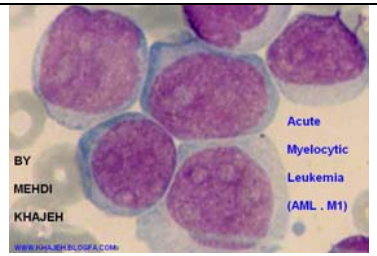
การตรวจต่าง ๆ จะเหมือนกับการตรวจ CSF แต่มีข้อที่แตกต่างจาก CSF ดังนี้ คือ

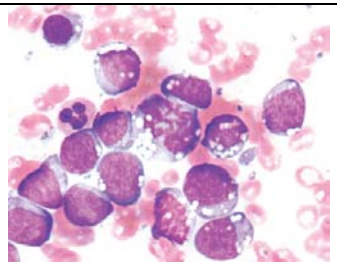
- สีของ effusion ถ้าเป็นสีเหลืองจะรายงานว่า yellow
- การนับเซลล์ นับเฉพาะเซลล์ที่มีนิวเคลียส ไม่นับเม็ดเลือดแดง
- การเตรียมสเมียร์จะปั่นด้วยความเร็วประมาณ 700-1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วถ้าสารน้ำขุ่นมาก ให้ดูดตะกอนไปใส่หลอด Wintrobe ปั่นอีกครั้งหนึ่ง แล้วดูดบริเวณ buffy coat มาทำสเมียร์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้ว fix ด้วย absolute methanol
- การย้อมสีจะเจือจางสีน้อยกว่า CSF เพราะในสารน้ำมีเซลล์จำนวนมาก จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของสีมากกว่าน้ำไขสันหลังโดยเจือจางสี 2 เท่า (สี 1 ส่วน : น้ำกลั่น 1 ส่วน) ย้อมสเมียร์ทิ้งไว้ 5 นาที จึงล้างด้วยน้ำประปา เซลล์ที่พบในสารน้ำ (effusion) แบ่งเป็น 2 พวก คือ

1. **เซลล์ชนิดไม่ร้ายแรง (Benign cell)** อาจเป็นเซลล์ที่พบได้ในกระแสเลือด ได้แก่ RBC, WBC เช่น neutrophil, eosinophil, lymphocyte, monocyte, atypical lymphocyte หรือ เป็นชนิด mesothelial cell และ macrophage
2. **เซลล์มะเร็ง (Malignant cell)** การพบเซลล์มะเร็งช่วยสนับสนุนโรคมะเร็งที่มีการแพร่กระจาย (metastatic carcinoma) หรือมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ

เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ตรวจพบใน effusions

	Cell	**ลักษณะรูปร่าง**	**ขนาดเซลล์**	**ลักษณะนิวเคลียส**			**ลักษณะ Cytoplasm**		**การเรียงตัวของเซลล์**
				N/C ratio	**Chromatin**	**Nucleoli**	**การติดสี**	**Vacuole**	
Benign Cell	Mesothelial cell		15-50 μ (2-4 เท่าของ lymph)	= 1 : 2 กลมหรือรี mostly กลางเซลล์	คล้าย lymphocyte แต่ไม่จับเป็นก้อน ๆ	ไม่ค่อยพบ ถ้าพบ ขนาดเล็ก < 3μ	Blue	อาจพบได้	Free cell อาจพบเป็นกลุ่ม ขอบเขตเซลล์ชัดเจน
Benign Cell	Activated mesothelial cell		15 – 50 μ	= 1 : 2 กลมหรือรี mostly กลางเซลล์	เหมือน Mesothelial cell	เหมือน Mesothelial cell	ติดสี blue เข้มกว่าปกติ	อาจพบขนาดเล็ก ๆ บริเวณรอบ ๆ นิวเคลียส	Free cell หรือจับกลุ่ม
Benign Cell	Macrophage		15 -50 μ	Nucleus กลมหรือรี eccentric ขนาดเล็กกว่า Mesothelial cell	ติดสีจางกว่า Mesothelial cell เส้น chromatin ละเอียดกว่า	ไม่พบ	Blue, มักพบ debris อยู่	พบเสมอ ขนาดใหญ่ เบียด Nucleus	Free cell

	Cell	**ลักษณะรูปร่าง**	**ขนาดเซลล์**	**ลักษณะนิวเคลียส**			**ลักษณะ Cytoplasm**		**การเรียงตัวของเซลล์**
				N/C ratio	**Chromatin**	**Nucleoli**	**การติดสี**	**Vacuole**	
Benign Cell	Plasma cell		15 – 20 μ	1 : 1 กลม หรือรี eccentric	Dense จับเป็นก้อนรอบนิวเคลียส	ไม่พบ	Blue เข้ม บริเวณรอบ Nucleus ติดสีจาง	ไม่พบ	Free cell
Malignant Cell	CA cell		ใหญ่มาก Vary	Nucleus ใหญ่อาจพบหลาย nucleus	หยาบติดสีเข้ม parachromatin ชัดเจน	ไม่พบ ถ้าพบขนาดใหญ่เห็นชัดเจน	- ติดสี blue เข้มทึบ - อาจพบติดสีแดงของ mucoprotein - บางเซลล์มี Cilia	พบได้ (ถ้าเป็น Signet cell vacuole ขนาดใหญ่ Nucleus ปูดออกนอกเซลล์)	เป็นกลุ่ม ball shape, acina, cord like ขอบเขต cell like กัน อาจพบ free cell
Malignant Cell	-Leukemic cell -Lymphoma cell	 Leukemic cell	เล็ก อาจ vary	(3-4 : 5)	Loose ติดสีอ่อน	อาจพบได้ ถ้าพบเห็นชัดเจน	blue	อาจพบได้ พบ typical in malignant lymphoma histiocytic type	Free cell

		 Lymphoma cell							

อนงค์ เพียรกิจกรรม Cytodiagnosis of C.S.F., Effusions and Lymph Node Imprint. กรุงเทพมหานคร : อักษรสัมพันธ์, 2523

ใบรายงานผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Specimen No. …….Patient name……

Specimen : ……..

Color : ……..

Tubidity : ……..

Nucleated cell : ……..

RBC : ……..

Neutrophil : ……..

Lymphocyte : ……..

Monocyte : ……..

Eosinophil : ……..

Basophil : ……..

Macrophage : ……..

Mesothelial cell : ……..

Malignant cell : ……..

……. : ……..

……. : ……..

ผู้รายงาน…….....

เลขที่……รหัสประจำตัว.....

Laboratory 9.

Special Hematologic Laboratory

ปฏิบัติการ

Immunohematology laboratory

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

1. ตรวจหมู่เลือด ABO และ Rh ของผู้ป่วยได้ถูกต้อง
2. ทำ cross matching โดยเลือก donor ที่เข้ากันให้แก่ผู้ป่วยได้
3. ตรวจ Antiglobulin test ทั้ง direct และ indirect AGT
4. แปลผลของการทำ Cross matching, antibody screening test (IAT) และ Direct antiglobulin test ได้

วิธีการปฏิบัติ

นำเลือดที่ได้รับไปทำการทดสอบเพื่อตรวจ

1. หมู่เลือด ABO พร้อมแปลผล
2. ตรวจหมู่เลือด Rh พร้อมแปลผล
3. นำเลือด donor มาทำการทดสอบ cross matching
4. ทำ antibody screening test (Indirect AHG)
5. นำเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยทำ Direct antiglobulin test พร้อมแปลผล

1. การตรวจหมู่เลือด ABO

การตรวจหมู่เลือด ABO จะต้องตรวจทั้ง cell และ serum grouping ยกเว้นเด็กอายุต่ำกว่า 3 เดือน

การตรวจ ABO grouping ทำได้ 2 วิธี คือ

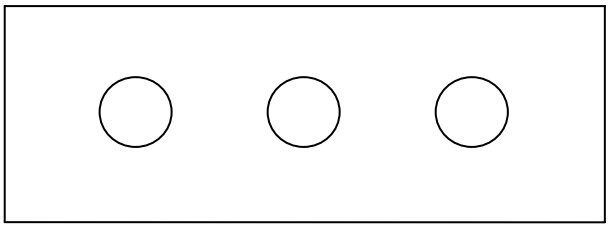
1. Slide method
2. Tube method

1. Slide method

- เป็นการตรวจหา A และ B แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงกับน้ำยา anti-A, anti-B และ anti-AB
- สิ่งส่งตรวจ : Clotted blood หรือเลือดที่เจาะจากปลายนิ้ว

วิธีทำ

- หยด anti-A, anti-B และ anti-AB บน Slide ที่แบ่งเป็น 3 ส่วน
- หยดเลือดไปข้าง ๆ anti-A, anti-B และ anti-AB ข้างละหยด
- ผสมเลือดกับ antiserum โดยใช้ไม้เขี่ยให้ผสมกัน และเปลี่ยนไม้เมื่อคนอันใหม่
- เอียง slide ไปมา อ่านผลการจับกลุ่มภายใน 2 นาที บันทึกและแปลผล



2. Tube method

2.1 Cell grouping : เป็นการตรวจหา A และ B แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงกับน้ำยา anti-A, anti-B และ anti-AB

สิ่งส่งตรวจ : Clotted blood (นำเลือดมาเตรียมเป็น 2-5% red cell suspension ในน้ำเกลือ)

วิธีทำ

1. หยด Anti-A ลงในหลอดที่เขียนว่า “A” 2 หยด
   หยด Anti-B ลงในหลอดที่เขียนว่า “B” 2 หยด
   หยด Anti-AB ลงในหลอดที่เขียนว่า “AB” 2 หยด
2. หยด 2-5% red cell suspension ในน้ำเกลือ ใส่ในหลอด A,B และ AB หลอดละ 1 หยด ผสมให้เข้ากัน หรือ อาจใช้ไม้เขี่ยเลือด นำไปใส่ในหลอด A,B และ AB (เปลี่ยนไม้ทุกครั้ง)
3. ปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 นาที
4. อ่านผลการจับกลุ่มโดยเขย่าเบา ๆ แล้วเอียงหลอดไปมาให้เซลล์หลุดจากก้นหลอด
5. บันทึกและแปลผล

2.2 Serum grouping : เป็นการตรวจ Anti-A และ Anti-B ในซีรั่ม กับ A1 cells และ B cells ที่เตรียมเป็น 2-5% cell suspension ในน้ำเกลือ

สิ่งส่งตรวจ : Clotted blood

วิธีทำ

1. หยดซีรั่มลงในหลอดที่เขียนว่า AC และ BC หลอดละ 2 หยด

2. หยด A1 cells 1 หยด ลงในหลอดที่เขียนว่า “AC”
   หยด B cell 1 หยด ลงในหลอดที่เขียนว่า “BC”
3. ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 วินาที
4. อ่านผลการเกิด hemolysis และการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
5. บันทึกและแปลผล

ตารางที่ 1 การแปลผลของ ABO grouping

Cell grouping			Serum grouping		Blood group
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A-cell	B-cell	
-	-	-	+	+	O
+	-	+	-	+	A
-	+	+	+	-	B
+	+	+	-	-	AB

2. การตรวจหมู่เลือด Rh

การตรวจ Rh typing ตรวจเฉพาะ D antigen โดยทำการทดสอบกับ anti-D สำหรับ antigen ตัวอื่นจะตรวจเฉพาะรายที่จำเป็นเท่านั้น ทำได้ 2 วิธี คือ

1. Slide Method
2. Tube Method

2.1 Slide method

สิ่งส่งตรวจ : Clotted blood, anticoagulated blood หรือเลือดที่เจาะปลายนิ้ว

วิธีทำ

1. หยด anti-D บน slide 1 หยด
2. หยดเลือด 1 หยด ลงข้าง anti-D
3. ใช้ไม้เขี่ยเลือดให้ผสมกัน เอียงไปมา
4. นำ slide ไปอุ่นบน Viewing box อุณหภูมิ 40-50^0 เอียงสไลด์ไปมา
5. อ่านผลการจับกลุ่มภายใน 2 นาที
6. ถ้ามีการตกตะกอน แสดงว่าเป็น Rh positive แต่ถ้าไม่ตกตะกอน จะเป็น Rh negative ซึ่งจะต้องทำ Antiglobulin test เพื่อดูว่าเป็น Rh negative จริง หรือ Weak D (D^u)

2.2 Tube method

วิธีทำ

1. หยด anti-D ในหลอดที่เขียน “D” 1 หยด
2. หยด 2-5% cell suspension ในน้ำเกลือ 1 หยด หรือใช้ไม้จิ้มเลือดใส่ในน้ำเกลือ
3. เขย่า นำไปปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 วินาที
4. อ่านผลการจับกลุ่ม โดยเอียงหลอดและเขย่าเบา ๆ ให้เซลล์หลุดจากหลอด
5. บันทึกและรายงานผล

การแปรผล

ถ้าให้ผลบวกทั้งโดยวิธี slide และ tube test เป็น Rh positive แต่ถ้าให้ผลลบจะต้องทดสอบ Antiglobulin test ต่อ

Test for Weak D (D^u)

6. ทำต่อจากข้อ 5 โดยนำหลอดเลือดไปอุ่นที่ 37^0C นาน 15-30 นาที
7. ปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 วินาที อ่านและบันทึกผล
8. ถ้าไม่มีการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง นำไปล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง โดยปั่นที่ 3,400 rpm นาน 45 วินาที ครั้งสุดท้ายเทน้ำเกลือออกให้เกลี้ยง เติม Antiglobulin serum 1 หยด
9. ปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 วินาที อ่านและบันทึกผลการจับกลุ่ม

ตารางที่ 2 การแปลผล Rh typing

Anti-D			**Rh typing**
Room temp. (RT)	**37^0C**	**Antihuman globulin test (AHG)**	
+			Rh positive
-	-	-	Rh negative
-	-	+	Weak D, D^u

3. การตรวจความเข้ากันได้ของเลือดผู้ป่วยกับผู้บริจาค (Cross matching)

เป็นการทดสอบระหว่างซีรั่มผู้ป่วยกับเซลล์ของ donor (major cross match) และซีรั่ม donor กับเซลล์ผู้ป่วย (minor cross match) เพื่อดูว่าเลือดผู้ป่วยเข้ากันได้กับ donor ปัจจุบัน minor cross match ไม่ทำเนื่องจากมีการตรวจกรองแอนติบอดีในเลือดของ donor ทุกยูนิตก่อนนำมาใช้ และมีการใช้เฉพาะ red cells

Cross matching แบ่งการตรวจเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. Immediate – spin หรือ Initial cross match เป็นการตรวจที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถตรวจ ABO incompatibility และ Ig-M antibodies ได้แก่ anti M, -N, -P, -Le^a และ –Le^b
2. Incubate ที่ 37^0C
3. Antiglobulin test (Indirect AGT) ใช้ตรวจ IgG antibodies ได้แก่ antibodies ในระบบ Rh, Kell, Kidd Duffy, Diego และระบบอื่น ๆ

วิธีทำ major cross matching

เลือก Donor ที่มีหมู่เลือด ABO และ Rh ตรงกับผู้ป่วยหรือต่างหมู่เลือดที่เข้ากันได้ (ตารางที่ 3)

1. หยดซีรั่มผู้ป่วย 2 หยด ในหลอดที่เขียนว่า AX (major cross match)
2. หยดเซลล์ Donor 2-5% cell suspension 1 หยด หรือใช้ไม้จุ่มเลือด 1 หยด
3. ปั่นที่ 3,400 rpm 15 วินาที
4. อ่านผลการเกิดฮีโมลัยซิส และการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
5. อุ่นที่ 37^0C นาน 30 นาที
6. ปั่นที่ 3,400 rpm. 15 วินาที
7. อ่านผลฮีโมลัยซิสและการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
8. ทำ Antiglubulin test ต่อโดยล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง โดยปั่นที่ 3,400 rpm. นาน 45 วินาที ครั้งสุดท้ายเทน้ำเกลือออกแล้วซับน้ำเกลือด้วยกระดาษทิชชูให้เกลี้ยง หยด Antiglobulin serum 1 หยด ผสมให้เข้ากัน
9. ปั่นที่ 3,400 rpm. 15 วินาที
10. อ่านผลการจับกลุ่มด้วยตาเปล่า และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผล

การแปลผล

ถ้าเกิดการจับกลุ่มหรือ hemolysis ขึ้นในขั้นตอนใดก็ตาม แสดงว่าเลือดที่ให้เข้ากันไม่ได้กับเลือดผู้ป่วย จะต้องหาสาเหตุและทำ antibody screening test และ antibody identification พร้อมกันนั้นก็หาเลือดยูนิตอื่นที่เข้ากันได้ให้แก่ผู้ป่วยในกรณีเร่งด่วน

- ถ้าทั้ง 3 ขั้นตอนไม่มีการตกตะกอนหรือ hemolysis แสดงว่าเข้ากันได้ รายงานว่า **Compatible**
- ถ้าขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งมีการตกตะกอนหรือ hemolysis แสดงว่าเข้ากันไม่ได้ รายงานว่า **Incompatible**

ตารางที่ 3 การเลือกเลือด Donor ให้แก่ผู้ป่วย

หมู่เลือดผู้ป่วย	หมู่เลือดของ Donor		
	ทางเลือกที่ 1	**ทางเลือกที่ 2**	**ทางเลือกที่ 3**
O	O	ไม่มี	
A	A	O Red cells	
B	B	O Red cells	
AB	AB	A หรือ B Red cells	O Red cells

4. Direct antiglobulin test (Direct Coomb' test)

เป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่จับอยู่บนเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในร่างกาย (in vivo) ใช้ในการวินิจฉัย

1. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA)
2. Hemolytic disease of the newborn (HDN)
3. Alloimmune reactions to recently transfusion red cells (TR)
4. Drug induce hemolysis

วิธีทำ

1. เติมน้ำเกลือในหลอดทดลองประมาณ 3 ใน 4 หลอด
2. หยด 2-5% cell suspension 1 หยด ลงในหลอด หรืออาจใช้ไม้จิ้มเลือด 1 ไม้
3. นำไปปั่นที่ 3,400 rpm. 45 วินาที เทน้ำเกลือออกให้หมด เขย่าให้เม็ดเลือดแดงหลุดจากก้นหลอด เติมน้ำเกลืออีก นำไปปั่นล้าง ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเทน้ำเกลือออกหมดแล้วซับน้ำเกลือด้วยกระดาษทิชชูให้เกลี้ยง
4. หยด antiglobulin reagent 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน
5. นำไปปั่นที่ 3,400 rpm 15 วินาที
6. อ่านผล โดยการเขย่าเบา ๆ และเอียงหลอดไปมาเพื่อให้เม็ดเลือดแดงหลุดจากก้นหลอด ดูการจับกลุ่ม บันทึกผล grading ความแรงของปฏิกิริยาว่าให้ผลเป็นกี่บวก
7. ถ้าดูด้วยตาเปล่าแล้วไม่เป็นการจับกลุ่ม ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดู weakly positive reaction ซึ่งต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การแปลผล

ถ้าเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแสดงว่ามีแอนติบอดีจับบนเม็ดเลือดแดง = Positive

5. Antibody Screening Test (Indirect Antiglobulin Test – IAT หรือ Indirect Coomb' test)

เป็นการตรวจแอนติบอดีในซีรั่ม โดยการนำซีรั่มมาผสมกับ screenig cells อุ่นที่อุณหภูมิ 37^0C นำเม็ดเลือดแดงมาล้างด้วยน้ำเกลือ เพื่อขจัด unbound globulin แล้วจึงเติม antiglobulin reagent ถ้าซีรั่มนั้นมี unexpected antiboy ตรงกับแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงที่ใช้ทดสอบจะเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

วิธีทำ

1. หยดซีรั่ม 2 หยดลงในหลอดที่ label ว่า "SC"
2. เติม 2-5% Screening red cells หรือ selected pools O red cells 1 หยด
3. ผสม นำไปปั่นที่ 3,400 rpm นาน 15 วินาที อ่านผล
4. อุ่นที่ 37^0C นาน 30 นาที
5. ปั่นที่ 3.400 rpm นาน 15 วินาที อ่านผลการเกิด hemolysis และการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง
6. ล้างเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง โดยปั่นที่ 3,400 rpm นาน 45 วินาที ครั้งสุดท้ายเทน้ำเกลือออกให้หมด แล้วซับน้ำเกลือด้วยกระดาษทิชชูให้เกลี้ยง เติม antiglobulin reagent 1 หยด
7. ปั่นที่ 3.400 rpm นาน 15 วินาที อ่านผลการจับกลุ่มด้วยตาเปล่า และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์บันทึกผล

การแปลผล

ถ้าให้ผลบวกในขั้นตอนใดก็ตาม แสดงว่าซีรั่มนั้นมี unexpected antibody ควรตรวจหาชนิดของแอนติบอดีโดยการทำ antibody identification

Indirect antiglobulin test เป็นวิธีทีใช้ในการตรวจกรอง unexpected antibody (antibody screening test) โดยใช้ reagent red cells group O ซึ่งต้องคัดเลือกให้มีแอนติเจนของหมู่เลือดที่มีความสำคัญทางคลินิกครบเรียกว่า screening red cells หรือ selected O cells ได้แก่ แอนติเจน C, D, E, c, e, M, N, S, s Mi^a, PI, Le^a, Le^b, K, k, Jk^a, Jk^b, Fy^a Fy^b, Xg^a, Di^a ดังนั้นการตรวจ antibody screening test ก็คือการตรวจหา unexpected antibody โดยวิธี Indirect AHG นั่นเอง

6. การตรวจหาอัตราการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี One Tube erytrocyte osmotic fragility test (OF test)

วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์อัตราการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยวิธี One Tube erythrocyte osmotic fragility test ใช้ในการตรวจกรองเพื่อวินิจฉัยธาลัสซีเมีย

ขอบเขต

ใช้เป็นวิธีปฏิบัติสำหรับการวิเคราะห์อัตราการแตกของเม็ดเลือดแดง ในเลือดของผู้ป่วยที่เก็บโดยใช้ EDTA หรือ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง

นิยามศัพท์

OF = Osmotic fragility

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือ

5.1.2 เครื่อง centrifuge

2. อุปกรณ์

1. Tube ขนาด 10 ml
2. Autopipette 20 µl พร้อม Pipette Tips
3. Autopipette 5 ml พร้อม Pipette Tips หรือ Syringe ขนาด 10 ml
4. จุกยางที่ปิด Tube หรือ พาราฟิล์ม

3.น้ำยาและสารเคมี

- $Na_2HPO_42H_2O$ (Merk) 1.424 g
- $NaH_2PO_42H_2O$ (Merk) 0.232 g
- NaCl 2.812 g

เติมน้ำให้ครบ 1000 ml แล้วคนให้สารทั้ง 3 ชนิด ละลายจนหมด

- เติม 87% glycerin 14 ml

วิธีทำ

1. นำตัวอย่าง EDTA Blood ประมาณ 0.5 – 1 ml มาปั่นเหวี่ยงใน centrifuge 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
2. แยก plasma ออกทิ้งให้มากที่สุด
3. ใส่น้ำยา OF-Test ที่เตรียมไว้ 10 ml ใน Tube
4. ใช้ autopipette ดูด packed red cells ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 และ 2 ปริมาณ 10 µl ใส่ลงไปใน Tubeที่มีน้ำยา OF- test อยู่
5. ปิดปาก Tube ด้วยจุกยางหรือพาราฟิล์ม

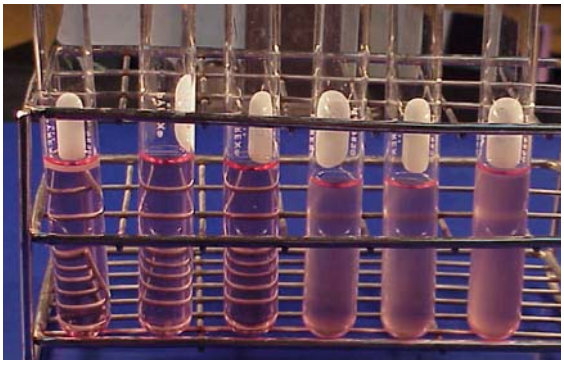
6. เขย่า Tube คว่ำและหงายขึ้น 2 – 3 ครั้ง ประมาณ 15 วินาที

7. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วอ่านผลด้วยตาเปล่า

การแปลผลและการอ่านผล

การอ่านผล

- สารละลายขุ่น : Positive
- สารละลายใส : Negative



1 2 3 4 5 6

รูปที่ 1. แสดงผลการตรวจ One tube osmatic fragility test โดยหมายเลข 1,2,3 สารละลายใส ให้ผล OF negative และหมายเลข 4,5,6 สารละลายขุ่น ให้ผล OF positive

การแปลผล

พาหะที่สำคัญได้แก่ α - thalssemia-1, β-thalassemia, Homozygous Hb E , Hb E trait บางรายและโรคธาลัสซีเมียทุกชนิดมีค่าของ OF Positive (Hb E trait 100 คน จะให้ผล OF Positive ประมาณ 60 คน อีก 40 คน เป็น False negative OF test)

ในคนปกติมีค่า OF Negative

บรรณานุกรม

1. ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี ธาลัสซีเมียชนิดร้ายแรง การรักษา การควบคุมและการป้องกัน จัดทำโดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ร่วมกับภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2543
2. เอกสารประกอบการสอนเรื่อง “Immunohematology and blood bank” โดย ภญ. พิมลพรรณ รัตนสิริวานิช
3. Vengelen Tyler V., ed., Technical Manual, 12 th ed., Bathesda, American Association f Blood Bank, 1996

Laboratory 10.

Special Laboratory

ปฏิบัติการ

10% KOH, AFB and Gram' s stain

วัตถุประสงค์

เมื่อนิสิตผ่านการฝึกปฏิบัติการนี้แล้ว นิสิตมีความสามารถดังนี้

- อธิบายหลักการย้อมสี AFB and Gram' s stain ได้อย่างถูกต้อง
- ทำการย้อมสี AFB and Gram' s stain ได้อย่างถูกต้อง
- ทำการตรวจและแปลผลการตรวจ AFB and Gram' s stain ได้อย่างถูกต้อง
- อธิบายหลักการ ทำการตรวจ และแปลผลการตรวจ 10%KOH ได้อย่างถูกต้อง

วิธีการปฏิบัติ

1. ดู Demonstration
   - การรายงานลักษณะรูปร่าง การติดสี การเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ
2. ปฏิบัติการ
   - นิสิตรายงานผลการตรวจ AFB จากสไลด์ที่แจกให้ 1 แผ่น / นิสิต 2 คน
   - นิสิตนำสไลด์ที่แจกให้ 1 แผ่น / นิสิต 1 คน ไปทำการย้อม Gram' s stain แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมรายงานผล

การตรวจ 10% KOH

หลักการ

ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา โดยคุณสมบัติของ KOH จะช่วยละลาย keratin จากสิ่งส่งตรวจ ทำให้เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้น slide จะใส ทำให้เห็นรูปร่างและโครงสร้างของเชื้อรารูปแบบต่างๆได้ชัดเจนขึ้น

เครื่องมือและน้ำยา

1. Slide and cover glass
2. น้ำยา 10% Potassium hydroxide (KOH)

วิธีทำ

1. หยด 10%KOH solution ลงบน slide 2-3 หยด
2. ขูดผิวหนังบริเวณขอบของรอยโรคที่สงสัยว่าเป็นเชื้อรา นำไปวางบนแผ่น slide ที่มีน้ำยา 10%KOH อยู่
3. ผสมน้ำยาและสิ่งส่งตรวจให้เข้ากัน
4. ปิดทับด้วย cover glass
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที หรือใช้ความร้อนช่วยโดยลนใต้ slide
6. นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x, 40x ตามลำดับ

ข้อควรระวัง

ขูดสิ่งส่งตรวจในปริมาณที่พอเหมาะ ถ้าน้อยเกินไปโอกาสที่จะไม่พบเชื้อมีได้สูง ถ้ามากเกินไปจะทำให้ดูยาก

การรายงานผล

รายงานตามที่พบ เช่น septate hyphae, non- septate hyphae, pseudohyphae, budding yeast, hyphae with budding yeast เป็นต้น

ถ้าไม่พบเชื้อรา ให้รายงานว่า negative

Gram' s stain

หลักการ

สี crystal violet จะทำปฏิกิริยากับ iodine เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน crystal violet-iodine complex ซึ่งมีขนาดของโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น ในแบคทีเรียแกรมบวกมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบเมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์หรือ acetone – alcohol ซึ่งเป็นสารละลายไขมันจะยังคงรักษาสารประกอบเชิงซ้อนได้อยู่ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะเกิดรูที่ผนังเซลล์ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียแกรมบวกจึงทำให้สารประกอบเชิงซ้อนหลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เมื่อย้อมทับด้วยสี safranin จึงทำให้แบคทีเรียแกรมลบติดสีแดงของ safranin ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกติดสีน้ำเงินของ crystal violet อยู่แล้ว

เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์

วัสดุอุปกรณ์

1. สไลด์
2. ไฟแช็คหรือไม้ขีดไฟ
3. loop or sterile swab

น้ำยาและสารเคมี

1. Crystal violet
2. Gram iodine
3. Decolorized (acetone : 95% alcohol = 1:1)
4. Safranin

วิธีย้อมสีแกรม

1. ป้ายสิ่งส่งตรวจหรือเชื้อที่ต้องการเป็นฟิล์มบาง ๆ บนแผ่นสไลด์ เมื่อแห้งแล้วนำไปตรึงด้วยความร้อน โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
2. ย้อมด้วย Crystal violet นาน 10 วินาที ล้างน้ำ
3. ย้อมด้วย Gram iodine นาน 20 วินาที ล้างน้ำ
4. ล้างด้วย acetone – alcohol หรือ 95% alcohol 2-3 วินาที ล้างน้ำ
5. ย้อมทับด้วย Safranin นาน 5 วินาที ล้างน้ำ
6. เมื่อสไลด์แห้ง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงินม่วง แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

การรายงานผล

1. **รายงานจำนวนแบคทีเรียหรือเซลล์** โดยเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียและเซลล์จากร่างกายที่พบต่อการดู 1 oil power field (opf)

- แบคทีเรียหรือเซลล์จากร่างกาย	> 10	cells/opf	= Many
- แบคทีเรียหรือเซลล์จากร่างกาย	5-10	cells/opf	= Moderate
- แบคทีเรียหรือเซลล์จากร่างกาย	1-5	cells/opf	= Few
- แบคทีเรียหรือเซลล์จากร่างกาย	<1	cell/opf	= Rare

2. **รายงานผลตามการติดสี รูปร่างและการเรียงตัว**

GRAM - POSITIVE

- NEGATIVE

MORPHOLOGY

- COCCI
- DIPLOCOCCI
- COCCOBACILLI
- BACILLI
- BACILLI (PLEOMORPHIC)
- BACILLI WITH TERMINAL SPORE
- BACILLI WITH SUBTERMINAL SPORE
- BACILLI WITH CENTRAL SPORE
- BACILLI WITH SUBTERMINAL AND CENTRAL SPORE
- BACILLI WITH METACHROMATIC GRANULE
- BACILLI WITH BIPOLAR STAINING

ARRANGEMENT

- IN SINGLE AND CLUSTER
- DIPLOCOCCI
- IN SINGLE AND CLUSTER
- IN SINGLE, CLUSTER, PAIR, AND SHORT CHAIN
- IN CHAIN
- IN BAMBOO APPEARANGE
- IN CHINESE LETTER OR PARISADE
- IN IRREGULAR ARRANGEMENT

ตัวอย่างการรายงานผล

- Many gram negative bacilli
- moderate gram positive cocci in chain
- moderate PMN and few epitelial cell

การเก็บเสมหะที่ดีสำหรับการย้อมสีแกรม (Adequate sputum collection)

หลังการย้อมสีแกรมแล้วต้องพบ squamous epithelium น้อยกว่า 10 cells/LPF (10x) หรือพบ neutrophils มากกว่า 25 cells/LPF (10x) จึงจะถือว่าการเก็บเสมหะนั้นเป็นการเก็บที่ดี และการแปลผลน่าเชื่อถือ

หมายเหตุ

1. การสเมียร์สไลด์หนาเกินไป จะทำให้การ decolorized ยาก และแบคทีเรียติดสีผิด
2. ไม่ควร fix slide ขณะที่สไลด์ยังไม่แห้งดี เพราะจะทำให้เซลล์แบคทีเรียมีรูปร่างผิดไป
3. ควรหยดสีให้ท่วมสไลด์อย่าปล่อยให้สไลด์แห้ง เพราะสีจะตกตะกอน ทำให้การดูผิดพลาดได้
4. ไม่ควร decolorized มากหรือน้อยเกินไป เพราะการติดสีของแบคทีเรียจะผิด

Acid fast stain

หลักการ

ป้ายเสมหะส่วนที่เป็นมูก เลือด หนอง ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วนำมาย้อม AFB stain ตามมวิธี Ziehi Neelsen ซึ่งเป็นการย้อม acid fast ที่ต้องใช้ความร้อน จะทำให้ basic carbol fuchsin ซึมเข้าผนัง cell ได้ดีขึ้น เมื่อเข้าสู่ cell แล้ว decolorization และ couterstain ด้วย methylene blue ตัวเชื้อจะติดสีแดงของ carbol fuchsin และเซลล์หรือเชื้อตัวอื่น ๆ จะติดสีน้ำเงินของ methylene blue วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว

เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์

วัสดุอุปกรณ์

1. สไลด์ชนิดที่มีริมฝ้า ที่สะอาดไม่มีรอยขีดข่วน (ไม่ควรนำกระจกสไลด์ที่เคยใช้ตรวจแล้วมาใช้อีก
2. ไฟแช็คหรือไม่ขีดไฟ
3. ไม่เขี่ย (ด้านทางมะพร้าวหรือไม้ไผ่เหลาสะอาด หักปลายก้านเพื่อเขี่ยเสมหะดียิ่งขึ้น
4. ดินสอเขียนแก้ว
5. กระป๋องใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ สำหรับใส่ก้านไม้เขี่ยเสมหะที่ใช้แล้ว

สีย้อม (Ziehl Neelsen)

1. Carbol fuchsin stain
2. 3% Acid alcohol
3. 0.1% Methylene blue

วิธีทำ

1. การเตรียมสไลด์

- เลือดแผ่นสไลด์ชนิดริมฝ้าที่ใหม่และสะอาด ไม่มีไขมัน ไม่มีรอยขีดข่วน
- เขียนหมายเลขบนแผ่นสไดล์
- หักไม้เขี่ยเสมหะเป็น 2 ส่วนยาวเท่า ๆ กัน ใช้ปลายด้านที่ขรุขระเขี่ยเสมหะส่วนที่ เป็นก้อนให้ก้อนเสมหะติดปลายไม้ขึ้นมา แล้วป้ายสไลด์แบบก้นหอย โดยการทาบสไลด์กับกระดาษที่มีวงขนาด 2X3 ซม. ขีดเสมะตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง ใช้ไม้อันเดิมวนเป็นวงเล็ก ๆ ถี่ (ขดหอย) ให้ทั่วทั้งสไลด์
- จับสไลด์ให้ด้านที่ป้ายเสมหะอยู่ด้านบน fix slide โดยลนผ่านเปลวไฟ 3-5 ครั้งละ 1-2 วินาที

2. วิธีการย้อม

- ราดสี Carbol funhsin ให้ท่วมทั้งสไลด์ ลนไฟใต้แผ่นสไลด์จนเกิดไอ (อย่าให้เดือด) ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด เอียงแผ่นสไลด์ให้น้ำออกให้หมด
- ฟอกสีออกโดยเท 3% Acid alcohol บนไสลด์จนไม่มีสีแดงของ Carbol fuchsin
- ล้างด้วยน้ำสะอาด เอียงแผ่นสไลด์ให้น้ำออกให้หมด
- ย้อมทับด้วยสี Methylene blue นาน 10 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด
- ทำให้แห้งด้วยกระดาษซับหรือทิ้งไว้ในอากาศ
- นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยหัว oil ถ้ามี AFB จะเห็นตัวเชื้อติดสีแดง พื้นสีน้ำเงิน

3. การอ่านสไลด์

ควรตรวจดูให้ทั่ว ให้ครอบคลุมเนื้อที่สเมียร์ให้มากที่สุด อย่างน้อย 2 แถวตามแนวนอนของสเมียร์หรือประมาณ 100 วงกล้อง สำหรับผู้ชำนาญอาจใช้เวลาอย่างน้อย 5 นาที

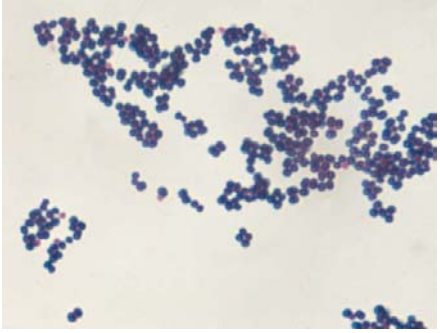
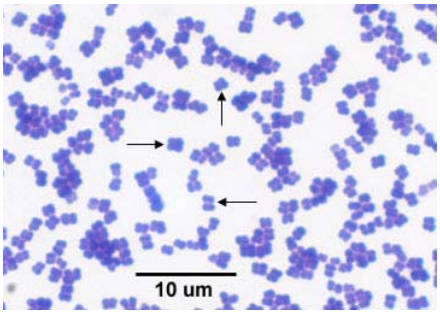
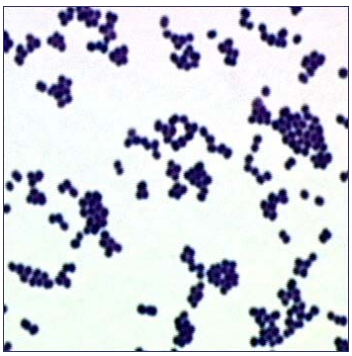
4. การรายงานผล

Reporting On Microscopy	
Number of acid fast bacilli seen	**Result report**
None / 100 oil fields	Negative
1-9 / 100 oil fields	Scanty
10-99 /100 oil fields	1+
1-10 / 1 oil fields	2+
>10 / 1 oil fields	3+

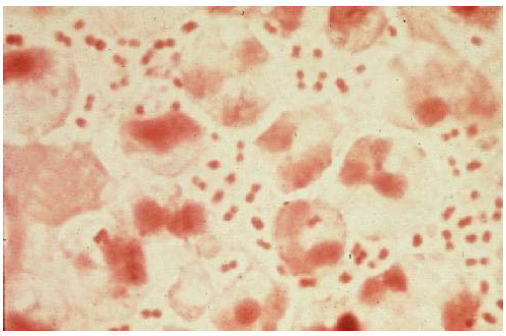
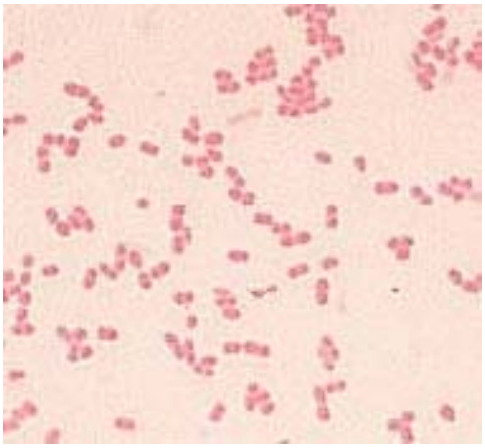
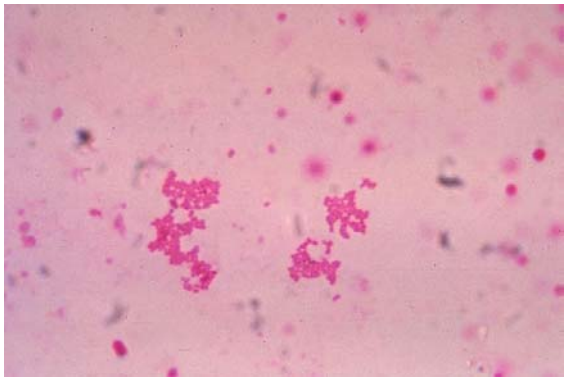
บรรณานุกรม

1. เกษแก้ว เพียรทวีชัย, การวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม, วิภาวดี แมนมนตรี, อรุณวดี ชนะวงศ์ และโชติชนะ วิลัยลักษณคณา, บรรณาธิการ, การตรวจหาแบคทีเรียวิทยาและราวิทยา, ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2538, 35-40.
2. การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นทางจุลชีววิทยาคลินิก, โดยสำหรับมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2541

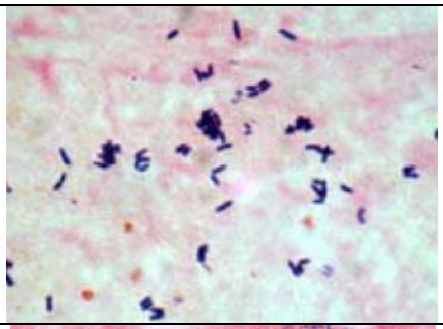
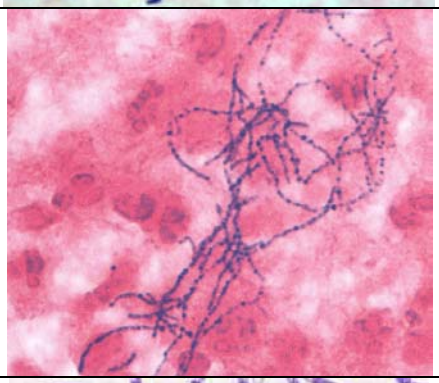
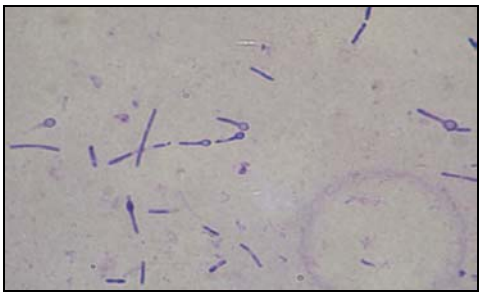
แสดงภาพจำลอง และการรายงานผล Gram stain : gram-positive cocci

ภาพจำลอง	การรายงานผล	เชื้อที่น่าจะเป็น
	Gram-positive cocci in clusters	*Staphylococcus*
	Gram-positive cocci in tetrads	*Micrococcus* *Staphylococcus*
	Large gram-positive cocci in masses	*Micrococcus*
	Gram-positive diplococci, some in chains	- *Streptococcus pneumoniae* (มักพบเป็นคู่ และสายสั้น) - *Streptococcus* - *Enterococcus* - *Peptostreptococcus*

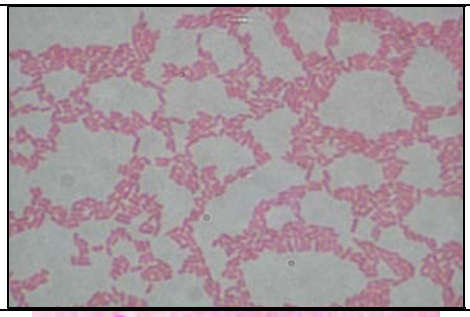
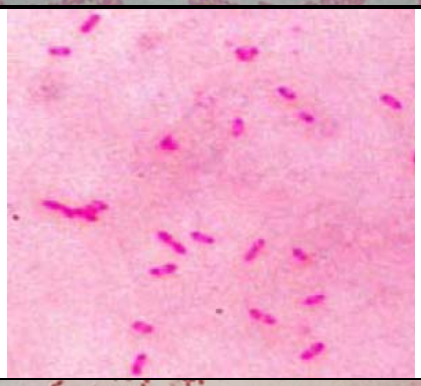
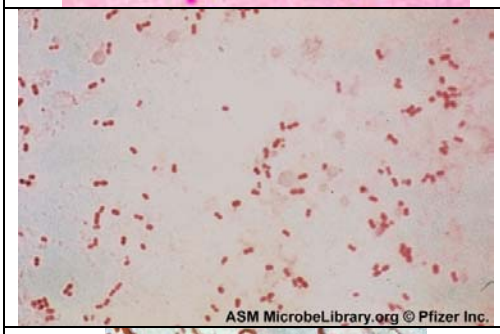
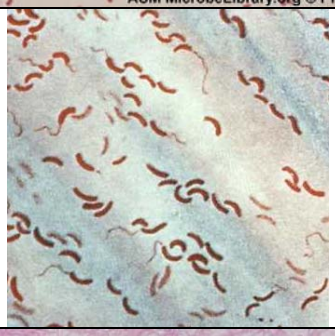
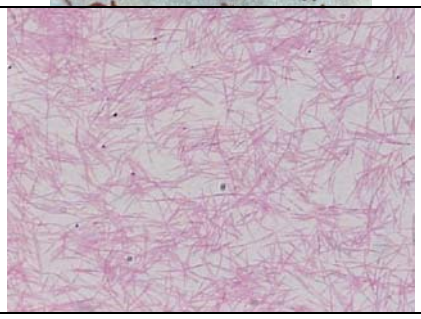
แสดงภาพจำลองและการรายงานผล Gram stain : gram-negative cocci และเชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียง

ภาพจำลอง	การรายงานผล	เชื้อที่น่าจะเป็น
	Intracellular and extracellular gram-negative diplococci	*Neisseria* *(N. gonorrhoeae* *N. meningitidis)* *Moraxella catarrhalis*
	Extracellular gram-negative diplococci	*Acinetobacter*
	Extracellular gram-negative cocci in pairs and in masses	*Veillonella* *(anaerobic gram-negative cocci)*

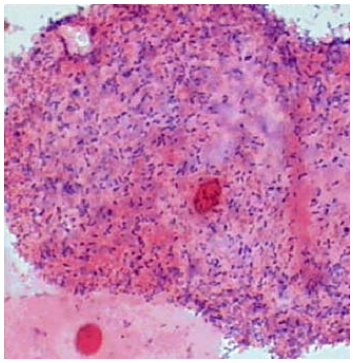
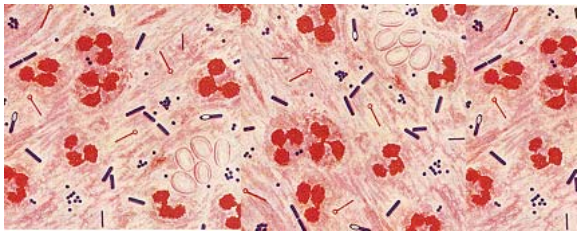
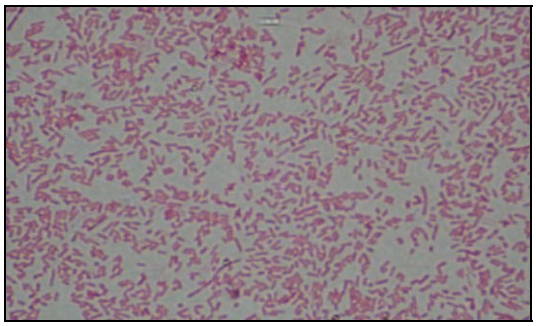
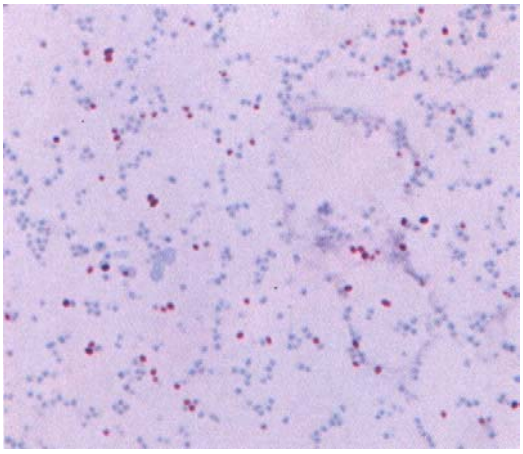
แสดงภาพจำลอง และการรายงานผล Gram stain : gram-positive bacilli (rods)

ภาพจำลอง	การรายงานผล	เชื้อที่น่าจะเป็น
	Gram-positive rods “Chinese letters” arrangements	*Corynebacterium* *Listeria*
	Branching gram-positive filaments	*Nocardia* *Actinomyces* *Streptomyces* (ควรย้อม Modified AFB)
	Large gram-positive rods (stained gram-variable)	*Bacillus anthracis* *Bacillus* spp. *Clostridium*
	Large gram-positive rods with terminal spores	*Clostridium (C .tetani)*

แสดงภาพจำลอง และการรายงานผล Gram stain : gram-negative rods และ spirochete

ภาพจำลอง	การรายงานผล	เชื้อที่น่าจะเป็น
	Gram-negative rods	Enterobacteria Nonfermentative bacilli
	Bipolar staining, gram-negative rods	*Burkholderia* *Pseudomallei*
	Gram-negative cocci and rods resembling *Acinetobacter*	*Acinetobacter*
	Gram-negative curve rods	*Vibrio* *Campylobacter* *Helicobacter*
	Gram-negative spirochete and gram- negative fusiform bacilli	Vincent' s organisms *(Borrelia and* *Fusobacterium)*

แสดงภาพจำลอง และการรายงานผล Gram stain : เชื้อกลุ่มที่ติดสีไม่สม่ำเสมอ/ไม่ดี/ไม่ติด

ภาพจำลอง	การรายงานผล	เชื้อที่น่าจะเป็น
	Clue cells and gram-variable rods	*Gardnerella*
	Mixed gram-negative and gram-positive bacterial resembling anaerobes	Mixed anaerobic infection Mixed aerobic and anaerobic infection
	Pleomorphic gram-negative rods	*Haemophilus*
	Gram-positive pleomorphic coccobacilli resembling *Rhodococcus*	*Rhodococcus* ควรย้อม Modified AFB