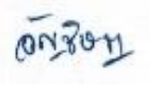
แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง
การตรวจ Gram Stain

WI-LAB-084

แก้ไขครั้งที่ 3

ผู้จัดทำ 

(นางสาวอัญชิษฐา โยธาจันทร์)
ผู้จัดการวิชาการจุลทรรศนศาสตร์คลินิก
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง

(อรกัญญา ทรงทอง)
ผู้จัดการคุณภาพ
1 กุมภาพันธ์ 2566

ผู้อนุมัติ พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)
ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ
1 กุมภาพันธ์ 2566

วันที่ประกาศใช้: 1 กุมภาพันธ์ 2566

1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ (Purpose of the examination)

เพื่อใช้เป็นวิธีการแยกแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยอาศัยรูปร่าง ขนาด ลักษณะเซลล์ติดสีแกรม ใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุการติดเชื้อเบื้องต้นอย่างรวดเร็วและใช้ในการประเมินคุณภาพของสิ่งส่งตรวจ

2. หลักการและวิธีการของขั้นตอนที่ใช้สำหรับการทดสอบ (Principle and method of the procedure used for examinations)

2.1 เมื่อแบคทีเรียที่ถูก smear บนสไลด์ ถูกย้อมด้วยสี crystal violet สีจะซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปใน cytoplasm ของแบคทีเรีย

2.2 เมื่อย้อมทับด้วยน้ำยา gram iodine ก็จะไปจับกับสี crystal violet เกิดเป็น crystal iodine complex ซึ่งมีโมเลกุลโตขึ้นจึงไม่สามารถหลุดออกจากตัวแบคทีเรียได้

2.3 เมื่อล้างด้วย alcohol หรือ alcohol acetone ซึ่งเป็นสารที่ละลายไขมันจะไปละลายไขมันที่มีอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างในลักษณะเดียวกัน รูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบย่อมโตกว่ารูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก crystal iodine complex จึงหลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่หลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ถ้าล้างมากเกินไปย่อมทำให้ crystal iodine complex ในแบคทีเรียแกรมบวกหลุดออกด้วย หรือถ้าล้างน้อยเกินไป จะทำให้ crystal iodine complex ในแบคทีเรียแกรมลบไม่หลุดออกจึงทำให้ติดสีผิด

2.4 เมื่อย้อมทับด้วยสี safranin Oจะไปติดที่แบคทีเรียที่ไม่มีสีอยู่ทำให้เป็นสีแดง คือแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียที่มีสีติดอยู่แล้วจะไม่ติดสี safranin Oจึงเห็นเป็นสีม่วงคือ แกรมบวก

2.5 คุณสมบัติของเชื้อในการติดสีขึ้นกับชนิดเชื้อ ภาวการณ์เพาะเชื้อ เชื้อที่มีอายุมากจะมีแนวโน้มที่จะถูกล้างสี crystal violet ออกด้วยน้ำยา decolorize ได้ง่าย

3. ข้อมูลจำเพาะด้านประสิทธิภาพ (Performance characteristics)

ไม่มี

4. ชนิดตัวอย่าง (Type of sample)

เลือด,เสมหะ,ปัสสาวะ,อุจจาระ,หนอง,สารคัดหลั่งในร่างกาย และสารน้ำต่างๆ

5. การเตรียมผู้ป่วย(Patient preparation)

การเก็บสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย พาหะ หรือผู้สัมผัสโรค และนำส่งห้องปฏิบัติการอย่างรวดเร็ว จะทำให้ผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและการแปลผลของการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ ดังนั้นผู้ที่ทำการเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ ต้องทราบว่าจะเลือกเก็บตัวอย่างตรวจอย่างไร เมื่อไร ใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ หรือ ใส่ภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาหารเก็บรักษาเชื้อชนิดไหนสำหรับที่จะส่งไปตรวจ

5.1 ชนิด ปริมาณ วิธีเก็บ ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจ การนำส่ง และการเก็บรักษา

สิ่งส่งตรวจ	ภาชนะ สำหรับเก็บ	วิธีเก็บ	การนำส่ง	การเก็บรักษา
เสมหะ	ใช้ขวดปราศจากเชื้อที่มีปากกว้าง มีฝาปิดได้แน่น หรือใช้ภาชนะที่แห้งสะอาดที่ยังไม่เคยใช้มาก่อนเช่น ถ้วยกระดาษเคลือบขี้ผึ้งหรือถ้วยพลาสติก เป็นต้น ปิดฝาให้เรียบร้อย	การเก็บเสมหะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับปอดหรือหลอดลม ควรเก็บในตอนเช้า หลังจากตื่นนอนใหม่ๆ ก่อนเก็บให้ทำความสะอาดช่องปากโดยการบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดธรรมดา เพื่อลดจำนวนเชื้อประจำถิ่นให้น้อยลง ห้ามใช้น้ำยาบ้วนปากหรือน้ำยาฆ่าเชื้อใดๆ ให้ผู้ป่วยนอนในลักษณะที่ศีรษะและไหล่อยู่ต่ำกว่าทรวงอกเป็นเวลา 10 นาทีแล้วให้ขากหรือไอลึกๆ แรงๆ จนได้เนื้อเสมหะมิใช่น้ำลาย แล้วคายเสมหะนั้นลงในภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจ	นำส่งทันที ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	ถ้าจำเป็นต้องเก็บไว้เกิน 2 ชั่วโมง ให้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง
สิ่งส่งตรวจจากคอ (Throat swab)	ใช้ขวดหรือหลอดทดลองที่สะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิดได้แน่น อาจหยดน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อเพื่อไม่ให้ swab แห้ง	สำหรับผู้ป่วยที่มีการอักเสบภายในช่องปาก ลำคอ หรือบริเวณต่อมทอนซิล ให้ผู้ป่วยอ้าปากกว้างๆ ใช้ไม้กดลิ้น กดบริเวณกลางลิ้นไว้ (ไม่ควรกดที่โคนลิ้นเพราะจะทำให้ผู้ป่วยเกิดการขย้อนและอาเจียนได้) แล้วใช้ไม้ swab ปราศจากเชื้อสอดเข้าไปป้ายต่อมทอนซิล 2 ข้าง และบริเวณที่อักเสบหรือมีหนอง ต้องระวังอย่าให้ถูกลิ้นหรือกระพุ้งแก้ม แล้วใส่ไม้ swab ในขวดหรือหลอดทดลองที่สะอาดปราศจากเชื้อหรือ Stuart transport medium ให้ลึกถึงก้นขวด หักไม้ส่วนที่ยาวเกินไปทิ้ง ปิดจุกให้แน่น	ให้นำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหลังเก็บ ห้ามเก็บไว้ในตู้เย็น	ไม่ควรเก็บรักษาให้นำส่งเพื่อทำการตรวจทันที Swab ที่อยู่ใน Stuart transport mediumเก็บไว้ได้นาน 48-72 ชั่วโมง (ยกเว้น เชื้อ GC ไม่เกิน 24 ชม.)ที่อุณหภูมิห้อง แต่ไม่ควรนำไปทำ direct examination
Nasal swab หรือ	ใช้กระดาษห่อกระจกสไลด์แต่ละแผ่น ส่วน nasal swab หรือ naso-	ให้ทำ nasal swab หรือ naso-pharyngeal swab ป้ายบางๆ บนแผ่น	ให้นำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหลังเก็บ	ไม่ควรเก็บรักษา ให้

สิ่งส่งตรวจ	ภาชนะสำหรับเก็บ	วิธีเก็บ	การนำส่ง	การเก็บรักษา
Nasopharyngeal swab สำหรับโรคไอกรน	pharyngeal swab ให้บรรจุในขวดหรือหลอดทดลองที่สะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิดได้แน่น	กระจกสไลด์ 1-2 แผ่น สำหรับย้อมสีแกรม ลนไฟอ่อน 2-3 ครั้งให้แห้ง(ถ้าจะส่ง เพาะเชื้อด้วยให้ทำ swab อีกครั้งด้วย swab อันใหม่ แล้วป้ายลงบนลงบน Bordet-Gengou medium ซึ่งใส่ยาเพนนิซิลินกันไม่ให้เชื้ออื่นขึ้น แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการ	ห้ามเก็บไว้ในตู้เย็น	นำส่งเพื่อทำการตรวจทันที
หนองจากแผล (Pus)	ขวดหรือหลอดทดลองสะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิด	1. กรณีเป็นแผลปิด ให้ใช้สำลีชุบ 70% alcohol หรือน้ำเกลือสะอาดปราศจากเชื้อ เช็ดทำความสะอาดบริเวณผิวหนังภายนอก รอให้แห้ง ใช้เข็มสะกิดให้แผลเปิด แล้วใช้ไม้ swab ป้ายหนองบริเวณแผลใส่ในขวดหรือหลอดทดลองสะอาดปราศจากเชื้อ หรือ Stuart transport medium ให้ลึกถึงก้นขวด ปิดฝา ถ้าเป็นตุ่มหนองขนาดใหญ่ อาจใช้เข็มและกระบอกฉีดยาเจาะดูดใส่ขวดที่สะอาดปราศจากเชื้อแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ 2. ในกรณีแผลเปิด ให้เก็บโดยใช้ไม้ swab ป้ายหนองบริเวณแผล แล้วใส่ในภาชนะสำหรับเก็บ 3. ในผู้ชายที่สงสัยว่าเป็นหนองในชนิดเรื้อรัง อาจนวดต่อมลูกหมากก่อน เมื่อมีหนองไหล	นำส่งทันที ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	1. ถ้าเป็น swab ควรทำการตรวจทันที 2. Swab ที่เก็บใน Stuart transport medium ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1-3 วัน 3. ถ้าเป็นหนองหรือ exudate ที่เก็บใส่ขวดหรืออยู่ในกระบอกฉีดยา อาจเก็บไว้ที่ RT ได้ไม่เกิน 2 ชม.

สิ่งส่งตรวจ	ภาชนะ สำหรับเก็บ	วิธีเก็บ	การนำส่ง	การเก็บรักษา
		ออกมาจึงป้ายด้วย swab แล้วใส่ในภาชนะสำหรับเก็บ		
น้ำจากช่องต่างๆ ของร่างกาย(Body fluid) ได้แก่ น้ำเจาะปอด น้ำในช่อท้อง น้ำจากข้อ เป็นต้น	ขวดหรือหลอดทดลองสะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิด	- แพทย์จะเป็นผู้เจาะน้ำจากส่วนต่างๆ ด้วยวิธี aseptic technique ใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ - สำหรับ swab จากตา ควรป้ายบนแผ่นกระจกสไลด์สำหรับย้อมสีแกรม 1-2 แผ่น (เนื่องจากน้ำตามี Lysozyme ซึ่งฆ่า bacteria ได้ ถ้าจะส่งเพาะเชื้อด้วยให้ทำการป้ายอีกครั้งด้วย swab อันใหม่ แล้วป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น blood agar plate หรือใส่ลงใน Stuart transport medium ปิดจุกแล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที ห้ามเก็บไว้ในตู้เย็น)	ส่งขวดบรรจุน้ำจากช่องต่างๆ นั้นทั้งขวด หรือใช้กระดาษห่อกระจกสไลด์แต่ละแผ่นที่ป้ายน้ำจากช่องต่างๆ นั้น นำส่งห้องปฏิบัติการทันที	สามารถเก็บไว้ที่ RT ได้ไม่เกิน 2 ชม. ห้ามเก็บไว้ในตู้เย็น ถ้าเป็น swab ควรทำการตรวจทันที .
น้ำไขสันหลัง (CSF)	ขวดหรือหลอดทดลองสะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิด	แพทย์จะเป็นผู้เจาะน้ำไขสันหลัง ด้วยวิธี aseptic technique ใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้	นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด	ห้ามแช่เย็น ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศา ซ
ปัสสาวะ	ใช้ขวดปากกว้างที่สะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาปิดได้แน่น	ให้เก็บปัสสาวะโดยวิธี clean-voided midstream ในตอนเช้า โดยถ่ายปัสสาวะส่วนแรกทิ้งไป แล้วเก็บปัสสาวะช่วงกลาง(ส่วนท้ายก็ทิ้งไป) บรรจุใส่ขวดสะอาดปราศจากเชื้อประมาณ 10-50 มล. จำนวน 1 ขวดการเปิดฝาภาชนะต้องไม่สัมผัสกับฝาด้านใน และต้องไม่	ส่งขวดบรรจุปัสสาวะนั้นทั้งขวด นำส่งห้องปฏิบัติการทันที ถ้าต้องการเพาะเชื้อเพื่อนับจำนวน bacteria ด้วย ควรส่งให้เร็วที่สุด ไม่ควรรอนานเกิน 2 ชั่วโมง เพราะเชื้อbacteriaที่ปนเปื้อนสามารถ	

สิ่งส่งตรวจ	ภาชนะ สำหรับเก็บ	วิธีเก็บ	การนำส่ง	การเก็บรักษา
		สัมผัสกับผิวด้านในของปัสสาวะ	เจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในน้ำปัสสาวะ ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อก่อโรคได้	
วัตถุตัวอย่างเบ็ดเตล็ดอื่นๆ	ขวดหรือหลอดทดลองสะอาดปราศจากเชื้อที่มีฝาหรือจุกปิด	ใช้ไม้พันสำลีป้ายบางๆ ลงบนแผ่นกระจกสไลด์หรือ บรรจุใส่ขวดสะอาดปราศจากเชื้อ	นำส่งทั้งขวดที่บรรจุสิ่งส่งตรวจนั้นหรือใช้กระดาษห่อกระจกสไลด์แต่ละแผ่นที่ป้ายสิ่งส่งตรวจนั้นแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ	ห้ามแช่เย็น ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.2 การเตรียมตัวอย่าง

ก่อนย้อมสีแกรม จำเป็นต้องมีการทำ smear สเมียร์ที่ดีควรได้เป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ของเชื้อและเซลล์ มีการกระจายสม่ำเสมอและสามารถดูลักษณะการเรียงตัวของเชื้อได้ชัดเจน ใช้สไลด์ที่สะอาดปราศจากไข เนื่องจากสิ่งส่งตรวจที่ส่งย้อมสีแกรมมีหลากหลายชนิด การย้อมสิ่งส่งตรวจจากตัวอย่างเดียวกันกับที่ต้องใช้ทำการเพาะเชื้อด้วย เช่น กรณีเป็นตัวอย่างที่เก็บมาด้วยไม้พันสำลี(swab) ต้องทำการเพาะเชื้อก่อนการทำ smear เพื่อย้อมสีแกรม อาจมีการปั่นแยกในกรณีที่สิ่งส่งตรวจเป็นของเหลวหรือน้ำจากช่องต่างๆ ได้แก่

5.2.1 **การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำไขสันหลัง** ให้เทน้ำไขสันหลังใส่ในหลอดแก้ว 10x60 มม. ที่ ปราศจากเชื้อ ปั่น 4,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสออก แล้วใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มส่วน ที่นอนก้นทาลงบนกระจกสไลด์สะอาดปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ อ่อนๆ 2-3 ครั้ง

5.2.2 **การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำจากช่องอื่นๆ** ถ้าน้ำจากช่องต่างๆ ที่เจาะมามีความหนืด ควรใช้ หลอดกาแฟ ดูดมาหยดใส่บนกระจกสไลด์สะอาด แล้วใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งกดลงไปแล้วลากออกจากกัน จะได้ฟิล์มที่สม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง แต่ถ้าน้ำที่เจาะได้ ไม่มีความหนืดให้ทำเช่นเดียวกับน้ำไขสันหลัง

5.2.3 **การเตรียมสเมียร์สำหรับปัสสาวะ** ให้นำปัสสาวะ ปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm 5 นาที แล้วเทส่วนใสออก แล้วใช้ Loop จุ่มตะกอนที่ก้นหลอดมาทำการสเมียร์ให้ได้ขนาด 2 x 3 ซม. ให้มีรูปแบบเป็นวงรีบนแผ่นนกระจกสไลด์สะอาด แล้วนำไปวางบนถาดสำหรับตากสไลด์หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง

5.2.4 **การเตรียมสเมียร์สำหรับเสมหะ** ใช้ไม้ไผ่สำหรับเสียบลูกชิ้นหักให้ปลายเป็นเสี้ยน จิ้มเสมหะ บริเวณที่มีลักษณะเป็นมูกข้น มีสีหรือปนเลือดมาทาบนแผ่นกระจกสไลด์ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง

5.2.5 การเตรียมสเมียร์จากสิ่งส่งตรวจที่เป็น swab

- ควรแยก swab สำหรับเพาะเชื้อแยกออกจากสำหรับย้อมสีแกรม
- การทำ smear ให้หมุน swab ไปตามยาวของสไลด์ ไม่ต้องกดแรง เพราะจะทำให้เซลล์แตก และการเรียงตัวของเชื้อเสียไป
- ในกรณีที่ได้รับ swab เพียงอันเดียว ให้ใส่ swab ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อเล็กน้อย แล้วนำไป vertex แล้วบิด swab กับฝาผนังด้านในหลอด และนำ swab ไป smear บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ ส่วนที่เหลือในหลอดใช้ในการเพาะเชื้อ

5.2.6 การเตรียมสเมียร์สำหรับสิ่งส่งตรวจอื่นๆ นำสิ่งส่งตรวจต่างๆ มาทำสเมียร์บางๆ บนแผ่นกระจกสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง

5.3 **การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ** อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 – 40 องศาเซลเซียส

5.4 **เงื่อนไขต่างๆ ที่ไม่ยอมรับสิ่งส่งตรวจ**

5.4.1 ข้อมูลการนำส่งตรวจที่จำเป็นไม่ครบถ้วน/ไม่ถูกต้อง เช่น ไม่มีใบนำส่งหรือรายละเอียดของสิ่งส่งตรวจไม่ครบถ้วนหรือไม่มีรายละเอียดเลย ชื่อผู้ป่วยในใบนำส่งตรวจไม่ตรงกับใน ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจ

5.4.2 สิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเก็บ-เก็บรักษาไม่ถูกวิธีจากการตรวจสอบด้วยตาเปล่าได้แก่

5.4.2.1 ใช้ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจไม่ถูกต้อง

5.4.2.2 สิ่งส่งตรวจแห้ง ภาชนะที่ใช้บรรจุมีการรั่วซึม ปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ เช่น ผม แมลง

5.4.2.3 เก็บได้สิ่งส่งตรวจไม่ตรงตามข้อกำหนด เช่น การเก็บเสมหะแต่ได้น้ำลาย, การเก็บปัสสาวะที่มีการปนเปื้อนเซลล์ที่หลุดร่วงมาจาก vagina หรือมีเลือดประจำเดือนปนมาด้วย

5.4.2.4 การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจในภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลารอนำส่ง ชนิดของ transport medium ที่ใช้ เช่น ปัสสาวะที่นำส่งตรวจช้าหรือทิ้งไว้นานเกินไปจน bacteria หลายชนิดเจริญเติบโตบดบังเชื้อก่อโรค หรือเข้าใจผิดว่าเป็นเชื้อก่อโรค เป็นต้น

5.4.3 สิ่งส่งตรวจที่ได้จากการเก็บ-เก็บรักษาไม่ถูกวิธีจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สิ่งส่งตรวจบางชนิดอาจไม่สามารถตรวจสอบความถูกต้องของการเก็บสิ่งส่งตรวจได้ด้วยตาเปล่าอย่างเดียว จึงต้องมีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้แก่ เสมหะ และปัสสาวะ เป็นต้น

สิ่งส่งตรวจ	สิ่งที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์		ผลการตรวจรับสิ่งส่งตรวจ (คุณภาพของสิ่งส่งตรวจ)
	Epithelial cell	WBC	
เสมหะ	มากกว่าหรือเท่ากับ 10 cells/LPF โดยดูจาก smear ที่ผ่านการย้อมแกรมแล้ว	ไม่เกิน 25 cells/LPF	ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ (ขอเก็บสิ่งส่งตรวจใหม่)
ปัสสาวะ	Squamous Epithelial cell มากกว่า 5 cellls/HPF โดยการดูจากตะกอนปัสสาวะในขณะตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ (U/A) ถ้าพบในผู้หญิงอาจเป็นเซลล์ที่หลุดร่วงมาจากบริเวณปากช่อง		ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ (ขอเก็บสิ่งส่งตรวจใหม่)

สิ่งส่งตรวจ	สิ่งที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์		ผลการตรวจรับสิ่งส่งตรวจ (คุณภาพของสิ่งส่งตรวจ)
	Epithelial cell	WBC	
	คลอดหรือ vulva หรือปนเปื้อนมาจากตกขาว(leukorrhea)		

6. ชนิดของภาชนะและสารเติมแต่ง (Type of container and additives)

ใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ หรือ ใส่ภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อตามความเหมาะสม

7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (Required equipment and reagents)

ชุดน้ำยา Gram stain ประกอบด้วยน้ำยา 4 อย่าง ดังนี้

(1) สี Crystal violet

(2) น้ำยา gram iodine

(3) น้ำยา decolorize ได้แก่ 95% ethyl alcohol หรือ alcohol-acetone(1:1)

(4) สี Safranin O

8. การควบคุมสภาวะแวดล้อมและความปลอดภัย (Environmental and safety controls)

8.1 สิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่อาจมีการปนเปื้อนเชื้ออันตรายต่างๆ ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรสวมถุงมือทุกครั้งก่อนปฏิบัติการตามหลัก Universal Precaution ขณะเตรียมและ fix สเมียร์จะต้องปฏิบัติการใน ตู้ Biohazard

8.2 อุณหภูมิห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 – 40 องศาเซลเซียส

9. ขั้นตอนการสอบเทียบตรวจสอบ(Calibration procedures)

ไม่มี

10. ขั้นตอนของกระบวนงาน(Procedural Steps)

10.1 **ขั้นตอนการย้อมแกรม**

10.1.1 นำกระจกสไลด์ที่ถูกป้ายสิ่งส่งตรวจลงไปแล้วมาวางไว้บน rack ย้อม (เป็นสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนการตรียมสิ่งส่งตรวจ ที่ผ่านการป้ายตัวอย่างตรวจทำ smear ที่บางอย่างสม่ำเสมอบนกระจกสไลด์สะอาดราศจากไขมัน ปล่อยให้แห้งแล้ว fix ด้วยความร้อนอ่อนๆ จากเปลวไฟของตะเกียงเพื่อให้สิ่งที่ป้ายติดแน่นกับสไลด์)

10.1.2 ย้อมด้วย Crystal violet นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา

10.1.3 ย้อมซ้ำด้วย gram iodine นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา

10.1.4 ล้างสีออกด้วยน้ำยา decolorize นาน 3-5 วินาที แล้วล้างตามด้วยน้ำประปาทันที (ขั้นตอนนี้ถ้าล้างด้วย decolorize นานกว่าเวลาที่ระบุมักจะทำให้การติดสีผิดคือทำให้ bacteria แกรมบวก ติดสีแดงกลายเป็น แกรมลบ)

10.1.5 ย้อมทับด้วย Safranin นาน 30 วินาที

10.1.6 ล้างด้วยน้ำประปาจนไม่มีสีซึมออกให้เห็น ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้อง จุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า และ 10x100 เท่า

10.2 **การอ่านผลแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Macroscopic Examination)**

10.2.1 ตรวจดูคุณภาพทั่วไปของ smear ด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า

- ดูว่า decolorized ดีหรือไม่ ถ้าย้อมได้ดีพื้นหลังต้องสะอาด
- ถ้ามีเม็ดเลือดขาวต้องย้อมติดสีแกรมลบ
- ไม่ควรมีตะกอนสี ต้องระวังไม่อ่านตะกอนสีเป็นเชื้อแบคทีเรีย
- ดูความหนาของ smear ว่าเซลล์ไม่ทับซ้อนกันและจะไม่ทำให้แปลผลผิด

10.2.2 ตรวจดูด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า เพื่อดูว่ามีการอักเสบหรือไม่ โดยดู

- จำนวนของ PMNs, mononuclear cell
- จำนวนของ squamous epithelial cells และแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น
- ตำแหน่งและการเรียงตัวของแบคทีเรีย

หมายเหตุ การตรวจดูเซลล์จากร่างกาย ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (PMN และ Mononuclear cell) และ เซลล์บุผนัง(epithelial cell) เป็นต้น เซลล์เหล่านี้ทั้งหมดจะติดสีแดงของ safranin การตรวจดูเซลล์จากร่างกาย มีวัตถุประสงค์ดังนี้

(1) ตรวจดูคุณภาพของสิ่งส่งตรวจว่าเก็บได้ถูกต้องเพียงใด เช่น ในสเมียร์ที่ย้อมแกรมซึ่งเตรียมจากเสมหะ การตรวจพบ WBC ไม่เกิน 25 cells/LPF และ/หรือพบ Epithelial cell ตั้งแต่ 10 cells/LPF ขึ้นไป แสดงว่าเป็นน้ำลายมิใช่เสมหะ ให้ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ และดำเนินการขอให้เก็บสิ่งส่งตรวจใหม่พร้อมทั้งให้คำแนะนำวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ถูกต้องด้วย แต่ถ้าตรวจพบ ciliated epithelial cell แสดงว่าสิ่งส่งตรวจนั้นเป็นเสมหะจริงเป็นต้น

(2) ประเมินสาเหตุหรือระยะของการติดเชื้อ เช่น การตรวจพบ PMN จำนวนมาก มักแสดงให้เห็นว่ามีการติดเชื้อ bacteria และเป็นการติดเชื้อในระยะแรกด้วย แต่ถ้าพบเซลล์พวก mononuclear cell ส่วนมากมักเป็นการติดเชื้อไวรัส วัณโรค เชื้อรา หรือเป็นการติดเชื้อ bacteria แบบเรื้อรัง

10.2.3 ตรวจดูด้วยกำลังขยาย 10x100 เท่า **โดยดูหลายๆ พื้นที่ เพื่อดูว่ามีเชื้อหรือไม่**

- ถ้าไม่เห็นเชื้อให้รายงานว่า ***"No organism seen"***
- ถ้าพบเชื้อ ให้รายงานคร่าวๆ และบอกลักษณะของเชื้อที่พบ ได้แก่ ติดสีแกรม, รูปร่าง (morphology) และกรณีพบการเรียงตัวที่มีลักษณะเฉพาะชัดเจนอาจเพิ่มการอ่านผลลักษณะการเรียงตัว(arrangement) ด้วยได้ ลักษณะที่พบจากการดูสเมียร์มีดังนี้
  (1) การติดสี ถ้าเป็น Gram positive จะติดสีม่วง ส่วน Gram negative จะติดสีแดง
  (2) ลักษณะรูปร่างพบได้หลายแบบตาม Genus/Species ของ bacteria เช่น
    - Cocci
    - Diplococci
    - Coccobacilli
    - Bacilli
    - Bacilli with pleomorphic appearance

- 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

(3) การเรียงตัว ที่พบบ่อย เช่น

- Bacteria อยู่เดี่ยวและกลุ่ม รายงาน Single and Cluster
- Bacteria อยู่เป็นคู่และเรียงเป็นสายสั้น รายงาน in pair and short chain
- Bacteria อยู่ไม่เป็นระเบียบ รายงาน irregular arrangement
- Bacteria เรียงตัวคล้ายอักษรจีน รายงาน in Chinese letter or palisades

ตัวอย่างการอ่านผลการติดสี ลักษณะรูปร่าง และการเรียงตัว ที่พบบ่อย เช่น

- Gram positive cocci in pair and short chain
- Gram positive bacilli with round terminal spore
- Gram negative pleomorphic bacilli with capsule
- Gram negative diplococci (kidney shape)
- Gram positive diplococci (lancet shape)
- Gram negative bacilli with bipolar staining
- Gram positive cocci in single, pair and cluster

10.2.4 ตรวจดูรูปร่างของแบคทีเรียที่พบเป็นส่วนใหญ่

- **ดูรูปร่างโดยรวม** ว่าเป็นกลุ่มใด เช่น coccus, coccoid, coccobacilli, bacilli, Fragment, yeast-like
- **ลักษณะปลายเซลล์** กลม แบน ป่องออก เว้าเข้า การบวมออกข้างๆ แสดงว่าอาจมีสปอร์ แต่อาจเกิดจาก vacuole ก็ได้ มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือติดสีไม่แน่นอน
- **ลักษณะด้านข้าง** เป็นลักษณะขนาน ทรงรี เว้า หรือไม่แน่นอน
- **รูปร่างไม่แน่นอน(pleomorphism)** ซึ่งอาจใช้คำว่า diphtheroid หรือ colyneform ในการบรรยายลักษณะของแคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งที่มีรูปร่างไม่แน่นอน หรือติดสีไม่สม่ำเสมอ เรียงตัวเป็นซี่รั้ว หรือเป็นมุม (V และ L shape)

10.3 **การตรวจสอบการย้อมแกรม**

หลังจากรายงานการย้อมแกรมแล้วให้เก็บสไลด์ไว้นานพอที่จะนำมาดูใหม่ได้ โดยเฉพาะในรายที่ส่งเพาะเชื้อด้วย การเก็บสไลด์มีวิธีการดังนี้

10.3.1 ซับ oil ออก

10.3.2 เก็บในกล่องเก็บสไลด์ ไว้อย่างน้อย 7 วัน

11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ(Quality Control Procedures)

11.1 ตรวจดูสีที่ใช้ย้อมทุกวันว่าไม่มีตะกอนสี ถ้ามีควรกรองก่อนใช้ การระเหยมีผลต่อคุณภาพของสีที่ใช้ จึงไม่ควรเทสีใส่ขวดที่ใช้ในงานประจำวันครั้งละมากๆ

11.2 ทำการย้อมเชื้อในวัสดุควบคุมคุณภาพที่เตรียมจากเชื้อมาตรฐาน ดังนี้

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 สำหรับทำ IQC gram positive
- *Escherichia coli* ATCC 25922 สำหรับทำ IQC gram negative

หรืออาจใช้สิ่งที่ขูดมาจากซอกฟันมาใหม่ๆ นำมาย้อมแทนวัสดุควบคุมคุณภาพ เนื่องจากมีทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

ต้องย้อมเชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพทุกครั้งที่เปลี่ยนกล่องใหม่ หรือ Lot ใหม่หรือแบ่งมา และสัปดาห์ละ 1 ครั้งเฉพาะในวันที่มีการใช้สีย้อมตัวอย่างผู้ป่วย

11.3 ลงบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ IQC sample ลงในแบบบันทึกการควบคุมคุณภาพสี Gram (FM-LAB-239)

12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ(Interlaboratory comparisons)

12.1 เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาจุลชีววิทยาคลินิก กองทดสอบความชำนาญ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ความถี่ที่ต้องวิเคราะห์ EQA/PT sample พร้อมกับ ตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยปีละ 3 ครั้ง

12.2 เมื่อผลประเมินไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด ให้วิเคราะห์สาเหตุที่แท้จริง แก้ไขตามสาเหตุ และลงบันทึกในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

13. สิ่งรบกวนการทดสอบ(Interferences)

ไม่มี

14. หลักการของขั้นตอนคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ รวมทั้งค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการทดสอบเชิงปริมาณ (Principle of procedure for calculating result including,whererelevant,the measurement uncertainty of measured quantity values)

ไม่มี

15. ช่วงค่าอ้างอิงทางชีวภาพหรือค่าการตัดสินใจทางคลินิก (Biological reference intervals or clinical decision values)

ในคนปกติหากย้อม Gram' s stain ในสิ่งส่งตรวจจากบริเวณที่ปราศจากเชื้อ(sterile site) เช่น น้ำไขสันหลัง เลือด(H/C) น้ำจากข้อ เป็นต้น จะตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย หากเป็นบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ Sterile site เช่น เสมหะ น้ำลาย อุจจาระ ปัสสาวะ เป็นต้น สามารถพบเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น ณ บริเวณนั้นๆ ได้

16. ช่วงค่ารายงานผลการทดสอบ (Reportable interval of examination results)

16.1 สำหรับการรายงานผลการย้อมสีแกรมจากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย ให้ตรวจด้วยกำลังขยาย 10x100 เท่า อย่างน้อย 20 field ให้รายงานผลว่าพบเชื้อเมื่อเห็นเชื้อเฉลี่ย 1 เซลล์หรือมากกว่า per oil immersion field ซึ่งแสดงว่ามีเชื้อ ≥ 10^5 CFU/mL

16.2 การรายงานผลย้อมสีแกรม ให้รายงานจำนวน Bacteria การติดสีแกรม-รูปร่างลักษณะ–การเรียงตัว และจำนวนเซลล์จากร่างกาย โดยอาศัยหลักดังนี้

16.3 รูปแบบการรายงานจำนวน

จำนวน	ความหมาย
Rare	มีเซลล์จากร่างกายหรือ Bacteria น้อยกว่า 1 cell/oil field
Few	มีเซลล์จากร่างกายหรือ Bacteria 1 - 5 cells/oil field
Moderate	มีเซลล์จากร่างกายหรือ Bacteria 5 - 10 cells/oil field
Many	มีเซลล์จากร่างกายหรือ Bacteria มากกว่า 10 cells/oil field

16.4ตัวอย่างการรายงานผลแกรมจาก pus smear

Number-Gram-Morphology-Arrangement	PMN	Mononuclear cell	Epithelial cell
Many gram negative bacilli Moderate gram negative diplococci(kidney shape)	Many	Few	Rare

16.5ตัวอย่างการรายงานผลแกรมจาก Sputum smear

Specimen	Number-Gram-Morphology-Arrangement	PMN	Mononuclear cell	Epithelial cell
Pus	Moderate gram negative diplococci (kidney shape)	Many	Few	
Sputum	- Many gram negative bacilli - Moderate gram positive diplococci(lancet shape)	many (> 25 cells/LPF)	Few	Rare (< 10 cells/LPF)

เฉพาะการรายงานผลแกรมหรือ AFB stain จาก Sputum smear ต้องบอกคุณภาพของ Sputum ด้วยว่าเก็บมาอย่างถูกต้อง โดยรายงานเพิ่มเติมบริเวณข้างล่างของจำนวนเซลล์จากร่างกายได้แก่ PMN, Mononuclear cell และ Epithelial cell โดยมีรูปแบบการรายงาน คือ ถ้าเป็น PMN และ Mononuclear cell ให้รายงาน (> 25 cells/LPF) ส่วน Epithelial cellให้รายงาน (< 10 cells/LPF) ถ้าเก็บ sputum มาอย่างไม่ถูกต้องให้รายงานตรงข้ามกัน เช่น PMN < 25 cells/LPF , Epithelial cell > 10 cells/LPF

16.6 บันทึกผลที่ใช้รายงานลงในแบบบันทึกการดูสไลด์สำหรับตรวจหาเชื้อจุลชีพและใน LIS แล้วพิมพ์ใบรายงานผลจาก LIS เพื่อส่งมอบให้ผู้รับผลงาน

17 คำแนะนำ สำหรับการพิจารณาผลเชิงปริมาณเมื่อผลไม่ได้อยู่ในช่วงการวัด (Instructions for determining quantitative results when a result is not within the measurement interval)

ไม่มี

18 ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม (Alert /Critical values,Where appropriate)

รายงานแพทย์ด่วนเมื่อตรวจพบเชื้อจุลชีพในเลือดและสารน้ำที่มาจากส่วนสำคัญเช่น CSF ,Synovial fluid เป็นต้น

19 การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ (Laboratory clinical interpretation)

แปลผลจากการดูสไลด์สำหรับตรวจหาเชื้อจุลชีพร่วมกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆและอาการทางคลินิก

20 แหล่งที่มาของค่าความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (Potential sources of variation)

20.1 ถ้าไม่ปฏิบัติตามวิธีการย้อมโดยเคร่งครัด อาจทำให้ผลการย้อมติดสีผิดพลาด เช่น

- การ Decolorize นานเกินไป จนทำให้bacteria ติดแกรมลบหมด และการ Decolorize น้อยเกินไป จนทำให้bacteria ติดแกรมบวกหมด
- slide สกปรกสไลด์ที่ใช้ต้องสะอาดปราศจากไขมัน
- เตรียมสเมียร์หนาเกินไปจะทำให้ Decolorize ยาก และทำให้แบคทีเรียติดสีผิด การทำ smear ต้องทำให้ได้ film ที่บางสม่ำเสมอ
- ใช้ความร้อนมากเกินไปในการ fix smear หรือ การ fix สไลด์ขณะที่ตัวอย่างตรวจยังไม่แห้งดี เพราะจะทำให้เซลล์แบคทีเรียพอง ทำให้รูปร่างผิดไปจากเดิม
- การย้อมสีต้องใส่สีให้ท่วมสไลด์ อย่าปล่อยให้สีแห้ง เพราะจะทำให้เกิดมีตะกอนสีทำให้สไลด์ไม่สวยและอ่านผลยาก
- การเติม 5%$NaHCO_3$ 5 หยดเป็น Buffer ตามลงไปใน crystal violet จะช่วยให้ anaerobic bacteria ติดสีถูกต้องยิ่งขึ้น

20.2 คุณสมบัติของเชื้อในการติดสีขึ้นกับชนิดเชื้อ สภาวการณ์เพาะเชื้อ เชื้อที่มีอายุมากจะมีแนวโน้มที่จะถูกล้างสี crystal violet ออกด้วยน้ำยา decolorize ได้ง่าย

20.3 ไม่ควรย้อมสไลด์ครั้งละมากๆ

20.4 เชื้อแกรมบวกที่ย้อมติสีผิดเป็นแกรมลบได้ เนื่องจากมีการใช้ antibiotic ในผู้ป่วย ทำให้ส่วนประกอบของ cell wall ผิดไป เชื้ออายุมากไป หรือมี autolytic enzyme ซึ่งมีผลต่อ cell wall ทำให้ crystal violet ถูกชะออกง่าย เมื่อ decolorize

20.5 Bacteria ส่วนมากมักติดสีแกรมบวกได้ดี เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง และจะติดสีแกรมลบเมื่อเพาะเชื้อบนอาหารเหลว จึงทำให้สับสนได้ง่าย ในกรณีเช่นนี้ควรย้อม bacteria ที่เป็น young culture คือประมาณ 4 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียที่แบ่งตัวช้า และ 1 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียที่แบ่งตัวเร็ว จะได้ผลตรงตามความเป็นจริงมากขึ้น

20.6 เมื่อผลการย้อมแกรมได้ผลไม่ชัดเจน อาจต้องใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการวิธีอื่นๆ เช่น การเพาะเชื้อและการแยกชนิดของเชื้อ

21 เอกสารอ้างอิง (References)

21.1 การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นทางจุลชีววิทยาคลินิก, สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. บริษัท ไอ.คิว. บุ๊คเซ็นเตอร์ จำกัด. 2541 (RF-LAB-042).

21.2 คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 2561(MN-LAB-076)

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-084 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Gram Stain

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
11 พ.ย. 62	0	ฉบับแรก	ทนพญ. อัญชิษฐาฯ
1 พ.ย. 63	1	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	ทนพญ. อัญชิษฐาฯ
1 ก.ย. 64	2	แก้ไขหน้า 6 ข้อ 5.2.1, 5.2.2,5.2.3และหน้า 11 ข้อ 21.1 จาก “5.2.1 การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำไขสันหลังให้เทน้ำไขสันหลังใส่ในหลอดแก้ว 10x60 มม. ที่ปราศจากเชื้อ ปั่น 1,000-1,500 รอบ/นาที นาน 10-15 นาที แล้วใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มส่วนที่นอนก้นทาลงบนกระจกสไลด์สะอาดปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง 5.2.2 การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำจากช่องอื่นๆ ถ้าน้ำจากช่องต่างๆ ที่เจาะมามีความหนืด ควรใช้หลอดกาแฟ ดูดมาหยดใส่บนกระจกสไลด์สะอาด แล้วใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งกดลงไปแล้วลากออกจากกัน จะได้ฟิล์มที่สม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง แต่ถ้าน้ำที่เจาะได้ ไม่มีความหนืดให้ทำเช่นเดียวกับน้ำไขสันหลัง 5.2.3 การเตรียมสเมียร์สำหรับปัสสาวะนำปัสสาวะไม่ เทส่วนใสออก มาหยดลงบนแผ่นนกระจกสไลด์สะอาด 2-4 หยดหรือประมาณ 100-200 ไมโครลิตร ใช้ pipette tip เกลี่ยให้กระจาย แล้วนำไปวางบนถาดสำหรับตากสไลด์หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง 21.1 คู่มือการตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก, กองมาตรฐานชันสูตรสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์การศาสนา. กรุงเทพมหานคร. 2529 ” เป็น “5.2.1 การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำไขสันหลังให้เทน้ำไขสันหลังใส่ในหลอดแก้ว 10x60 มม. ที่ปราศจากเชื้อ ปั่น 4,000 rpm 5 นาที เทส่วนใส	ทนพญ. อัญชิษฐาฯ

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-084 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Gram Stain

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
		ออก แล้วใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อจุ่มส่วนที่นอนก้นทาลงบนกระจกสไลด์สะอาดปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง 5.2.2 การเตรียมสเมียร์สำหรับน้ำจากช่องอื่นๆ ถ้าน้ำจากช่องต่างๆ ที่เจาะมามีความหนืด ควรใช้หลอดกาแฟ ดูดมาหยดใส่บนกระจกสไลด์สะอาด แล้วใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งกดลงไปแล้วลากออกจากกัน จะได้ฟิล์มที่สม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง แต่ถ้าน้ำที่เจาะได้ ไม่มีความหนืดให้ทำเช่นเดียวกับน้ำไขสันหลัง 5.2.3 การเตรียมสเมียร์สำหรับปัสสาวะนำปัสสาวะปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสออก แล้วใช้ Loop จุ่มตะกอนที่ก้นหลอดมาทำการสเมียร์ให้ได้ขนาด 2 x 3 ซม. ให้มีรูปแบบเป็นวงรี บนแผ่นกระจกสไลด์สะอาด แล้วนำไปวางบนถาดสำหรับตากสไลด์หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง 21.1 คู่มือสำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก ,สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. บริษัทพ.ศ. พัฒนา ออนไลน์ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 2550 (RF-LAB-043)”	
1 ก.ย. 65	2	ทบทวนแล้ว ไม่มีการแก้ไข	ทนพญ. อัญชิษฐาฯ
1 ก.พ. 66	3	แก้ไขทั้งฉบับ ● หน้า 6 ข้อ 5.2 การเตรียมตัวอย่าง เพิ่มข้อมูลก่อนขึ้นข้อ 5.1 ว่า... **“ก่อนย้อมสีแกรม จำเป็นต้องมีการทำ smear สเมียร์ที่ดีควรได้เป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) ของเชื้อและเซลล์ มีการกระจายสม่ำเสมอ และสามารถดูลักษณะการเรียงตัวของ**	ทนพญ. อัญชิษฐาฯ

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-084 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Gram Stain

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
		เชื้อได้ชัดเจน ใช้สไลด์ที่สะอาดปราศจากไข เนื่องจากสิ่งส่งตรวจที่ส่งย้อมสีแกรมมีหลากหลายชนิด การย้อมสิ่งส่งตรวจจากตัวอย่างเดียวกันกับที่ต้องใช้ทำการเพาะเชื้อด้วย เช่น กรณีเป็นตัวอย่างที่เก็บมาด้วยไม้พันสำลี(swab) ต้องทำการเพาะเชื้อก่อนการทำ smear เพื่อย้อมสีแกรม” ● หน้า 6 ข้อ 5.2 การเตรียมตัวอย่าง แทรกข้อ 5.2.5 ว่า... 21.2.1 **การเตรียมสเมียร์จากสิ่งส่งตรวจที่เป็น swab** ● ควรแยก swab สำหรับเพาะเชื้อแยกออกจากสำหรับย้อมสีแกรม ● การทำ smear ให้หมุน swab ไปตามยาวของสไลด์ ไม่ต้องกดแรงเพราะจะทำให้เซลล์แตกและการเรียงตัวของเชื้อเสียไป ● ในกรณีที่ได้รับ swab เพียงอันเดียว ให้ใส่ swab ในน้ำเกลือปราศจากเชื้อเล็กน้อย แล้วนำไป vertex แล้วบิด swab กับฝาผนังด้านในหลอด และนำ swab ไป smear บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ ส่วนที่เหลือในหลอดใช้ในการเพาะเชื้อ ● หน้า 9 ข้อ 10.2 เพิ่มข้อความว่า... 10.2.1 ตรวจดูคุณภาพทั่วไปของ smear ด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า	

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-084 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Gram Stain

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ
		• ดูว่า decolorized ดีหรือไม่ ถ้าย้อมได้ดีพื้นหลังต้องสะอาด • ถ้ามีเม็ดเลือดขาวต้องย้อมติดสีแกรมลบ • ไม่ควรมีตะกอนสี ระวังไม่อ่านตะกอนสีเป็นเชื้อแบคทีเรีย • ดูความหนาของ smear ว่าเซลล์ไม่ทับซ้อนกันและจะไม่ทำให้แปลผลผิด 10.2.2 ตรวจดูด้วยกำลังขยาย 10x10 เท่า เพื่อดูว่ามีการอักเสบหรือไม่ โดยดู • จำนวนของ PMNs, mononuclear cell • จำนวนของ squamous epithelial cells และแบคทีเรียที่เป็นเชื้อประจำถิ่น • ตำแหน่งและการเรียงตัวของแบคทีเรีย • แก้ไข หน้า 11 ข้อ 12.1 จาก “เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาจุลชีววิทยาคลินิก สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์” เป็น “เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาจุลชีววิทยาคลินิก กองทดสอบความชำนาญ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์” • หน้า 14 ข้อ 21 เพิ่มข้อย่อยที่ 21.2 “คู่มือการปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 2561(MN-LAB-076)”	

ประวัติการแก้ไข/ทบทวนเอกสารคุณภาพ

ชื่อเอกสาร WI-LAB-084 : วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง การตรวจ Gram Stain

วัน/เดือน/ ปี	ฉบับแก้ไข ครั้งที่	รายละเอียด	ลงชื่อ

แผนกพยาธิวิทยา
โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง
การตรวจ Gram Stain

WI-LAB-084

แก้ไขครั้งที่ .....

ผู้จัดทำ

(นางสาวอัญชิษฐา โยธาจันทร์)
ผู้จัดการวิชาการจุลทรรศนศาสตร์คลินิก
...../...../.....

ผู้ทบทวน ร.ท.หญิง

(อรกัญญา ทรงทอง)
ผู้จัดการคุณภาพ
...../...../.....

ผู้อนุมัติ พ.อ.

(ฉัตรมงคล คนขยัน)
ผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการ
...../...../.....

วันที่ประกาศใช้: (วัน) (เดือน) (ปี)

บันทึกการควบคุมคุณภาพสี Gram

ความถี่ : สัปดาห์ละ 1 ครั้งในวันที่มีการใช้สีย้อมตัวอย่างผู้ป่วย(Each pack and each week of use) และทุกครั้งที่เปลี่ยนขวดหรือแบ่งสีย้อมมา

ชื่อสีย้อม: Gram stain			**วันที่เริ่มใช้สีย้อม LOT นี้ :** **ยี่ห้อ/ผลิตภัณฑ์ :**				Lot No.:	Exp. Date :
วัน เดือน ปี ที่ย้อมสี	รหัสตัวอย่าง SLIDE/ วันที่เตรียม	ผู้เตรียม SLIDE	ลักษณะการติดสีของ Control organism				**ผู้ทดสอบ**	**ผู้ตรวจสอบ**
			Escherichia coli, ATCC 25922		*Staphylococcus aureus*, ATCC 2592			
			GNB	GPB	GPC	GNC		