

วิธีปฏิบัติ

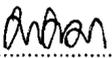
Work Instruction

เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสี Gram



กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์

โรงพยาบาลลำพูน

รหัสเอกสาร WI-BAC-002	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17
ผู้จัดทำ	<p> (นายปิยะพงศ์ ปินตา) นักเทคนิคการแพทย์ ชำนาญการ</p> <p>01 กพ 2564 วัน / เดือน / ปี</p>
ผู้ทบทวน	<p> (นางสาวศิริพร นันตา) ผู้จัดการวิชาการกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์</p> <p>01 กพ 2564 วัน / เดือน / ปี</p>
ผู้อนุมัติ	<p> (นายจรชิต กิติมา) ผู้จัดการคุณภาพกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์</p> <p>01 กพ 2564 วัน / เดือน / ปี</p>

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 1/9

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน/ แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
8 ก.ค. 2547	0	ทบทวนโดย นายบรรเลง ปัญจบุรี ไม่มีการแก้ไข
21 ก.ย. 2548	1	แก้ไขผู้ออกนามัติ
2 ต.ค. 2549	2	ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 เม.ย.2551	3	<ul style="list-style-type: none"> - แก้ไขรูปแบบวิธีปฏิบัติการตามข้อกำหนด ISO 15189 และอนุมัติใช้ - เปลี่ยนรหัสเอกสารจาก WI-LAB-010 เป็น WI-BAC-002 - แก้ไขผู้ทบทวน จากนักเทคนิคการแพทย์ เป็น ผู้จัดการวิชาการ - แก้ไขผู้ออกนามัติ จากหัวหน้ากลุ่มงานพยาธิวิทยา เป็น ผู้จัดการคุณภาพ
15 ก.ย.2551	4	- แก้ไขรูปแบบวิธีปฏิบัติให้เป็นไปตามข้อกำหนด ISO 15189:2007
1 เม.ย.2553	5	ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ต.ค. 2553	6	<ul style="list-style-type: none"> - แก้ไขหน้า 2/7 ข้อ 3. หลักการของวิธีการทดสอบ จาก Cytoplasm เป็น Cell wall - แก้ไขหน้า 5/7 ข้อ 8.2.3.1 การรายงานผล โดยการเปลี่ยนแปลงหลักเกณฑ์การแปลผลเป็น Rare ตรวจพบว่ามี Bacteria 0-1 cell/OPF Few ตรวจพบว่ามี Bacteria 1-5 cell/OPFหรือ WBC 1-9 cell/LPF Moderate ตรวจพบว่ามี Bacteria 6-30 cell/OPFหรือ WBC 10-25 cell/LPF Numerous ตรวจพบว่ามี Bacteria >30 cell/OPFหรือ WBC >25 cell/LPF

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 15	หน้า 2/9

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน/ แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
		<ul style="list-style-type: none"> - แก้ไขรูปแบบอักษร หน้า6/7 ข้อ10. วิธีการควบคุมคุณภาพ คำว่า <i>S.aureus</i> และ <i>E.coli</i> เป็นแบบ <i>S.aureus</i> และ <i>E.coli</i> - แก้ไขหน้า 7/7 ข้อ 19. เพิ่มเติมเอกสารอ้างอิง SD-BAC-004 (การตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและราวิทยา)
1 มี.ค. 2555	7	ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ส.ค. 2555	8	<ul style="list-style-type: none"> - แก้ไขชื่อกลุ่มงานพยาธิวิทยาเป็น”กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์” - แก้ไขหน้า 5/8 ข้อ7. จาก Decolorized (95% alcohol หรือ alcohol acetone) เป็น Decolorized (acetone alcohol) และข้อ 8.2.2.3 ล้างด้วย 95% alcohol หรือ alcohol acetone 1-2 ครั้ง เป็น ล้างด้วย acetone alcohol 1-2 ครั้ง - แก้ไขหน้า 6/8 ข้อ 9.2.3. การรายงานผล โดยการเปลี่ยนแปลงหลักเกณฑ์การแปลผลเป็น Rare ตรวจพบว่ามี Bacteria 0-1 cell/OPF Few ตรวจพบว่ามี Bacteria >1-5 cell/OPFหรือ WBC <10 cell/LPF Moderate ตรวจพบว่ามี Bacteria >5-30 cell/OPFหรือ WBC 10-25 cell/LPF Numerous ตรวจพบว่ามี Bacteria >30 cell/OPFหรือ WBC >25 cell/LPF - ข้อ 9.3.2 เปลี่ยนเป็นGram Negative ติดสีแดง, Gram Positiveติดสีม่วงเข้ม - แก้ไขหน้า7/8 a.การควบคุมภายใน จากเดือนละ 1 ครั้ง เป็นอาทิตย์ละ 1 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 3/9

บันทึกการแก้ไขเอกสาร

วันที่	ทบทวน/ แก้ไขครั้งที่	บันทึกการแก้ไข
1 ก.ย.2556	9	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.2557	10	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.2558	11	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ส.ค.2559	12	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.2560	13	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ก.ย.2561	14	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 เม.ย.2562	15	แก้ไขให้เป็นไปตามข้อกำหนดตามผลการประเมินระบบ ISO 15189 : 2012 และ ISO 15190 : 2003
1 เม.ย. 2563	16	- ทบทวน ไม่มีการแก้ไข
1 ก.พ. 2564	17	- แก้ไขชื่อทบทวนจากนางสาวกนกวรรณ ใจพิงค์ เป็นนางสาวศิริพร นันตา - แก้ไขชื่อผู้อนุมัติจากนายบรรเลง ปัญจบุรี เป็นนายครรชิต กิติมา

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 4/9

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมสี Gram

1. วัตถุประสงค์การทดสอบ

เพื่ออธิบายการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย โดยการย้อมสี Gram สำหรับช่วยในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียขั้นต้น

2. นิยามและคำย่อ

-

3. หลักการทดสอบ

เมื่อย้อมด้วย Crystal violet สีจะซึมเข้าไปใน cell wall ของแบคทีเรียและเมื่อย้อมทับด้วย gram iodine ก็จะเข้าไปจับกับ Crystal violet เกิดเป็น crystal iodine complex ซึ่งมีโมเลกุลโตขึ้นจึงไม่สามารถออกจากตัวแบคทีเรียได้ เมื่อล้างด้วย alcohol หรือ alcohol acetone ซึ่งเป็นสารที่ละลายไขมันจะไปละลายไขมันที่มีอยู่ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันที่มีผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างในลักษณะเดียวกันรูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบ่ม โดกว่ารูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก crystal iodine complex จึงหลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่หลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อล้างด้วย alcohol หรือ alcohol acetone อย่างถูกต้อง แต่ถ้าล้างมากเกินไปย้อมทำให้ complex ในแบคทีเรียแกรมบวกหลุดออกด้วย ในทำนองเดียวกันถ้าล้างน้อยเกินไป complex ในแบคทีเรียแกรมลบก็ไม่หลุดออกจึงทำให้ติดสีผิด เมื่อย้อมทับด้วย safranin จะไปติดที่แบคทีเรียที่ไม่มีสีอยู่ทำให้เป็นสีแดง คือแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียที่มีสีติดอยู่แล้วจะไม่ติดสี safranin จึงเห็นเป็นสีม่วงคือแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 5/9

4. คุณสมบัติทางเทคนิคของวิธีวิเคราะห์

4.1. ค่าความเป็นเส้นตรง

-

4.2. ค่าความแม่นยำ

-

4.3. ค่าความถูกต้อง

-

4.4. ค่าความไม่แน่นอน

-

4.5. ข้อจำกัดของการทดสอบ

-

4.6. ระยะเวลาของการวัด

-

4.7. ค่าจริงของการวัด

-

4.8. ความไว

-

4.9. ความจำเพาะ

-

5. สิ่งส่งตรวจและรายละเอียดที่ต้องตรวจสอบ

- น้ำไขสันหลังและน้ำจากส่วนต่างๆ ของร่างกายปัสสาวะ เสมหะ หนอง แผล ฟีต่างๆ

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 6/9

6. ประเภทของภาชนะบรรจุและสารที่ใช้เก็บตัวอย่าง

- ภาชนะพลาสติก ปากกว้าง ที่ไม่มีการดูดซึม มีฝาปิดมิดชิด

7. เครื่องมือและน้ำยาที่ใช้

7.1 น้ำยาและสีย้อม

7.1.1 Crystal violet

7.1.2 Gram iodine

7.1.3 Decolorized (Acetone alcohol)

7.1.4 Safranin

7.2 นาฬิกาจับเวลา

7.3 กล้องจุลทรรศน์

8. วิธีการสอบเทียบ

-

9. วิธีการตรวจวิเคราะห์

9.1 การเก็บและเตรียมสิ่งส่งตรวจ

การเก็บเสมหะ เก็บเสมหะตอนเช้าหลังจากตื่นนอนใหม่ ๆ โดยให้ผู้ป่วยบ้วนปากหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำธรรมดา ให้ผู้ป่วยไอลึก ๆ แรง ๆ บ้วนเสมหะใส่ขวดภาชนะพลาสติก ปากกว้าง ที่ไม่มีการดูดซึม มีฝาปิดมิดชิด

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 7/9

9.2 วิธีการตรวจ

9.2.1 การเตรียมสไลด์ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

9.2.1.1 ใช้ดินสอเขียนบนสไลด์ฝาโดยเขียน Lab NO. (มี 7 ตัว XXX-XXXX) ให้ตรงกับเลข Barcode ที่ติดมากับใบ Request คนไข้

9.2.1.2 ป้ายสิ่งส่งตรวจที่ต้องการย้อมบนสไลด์สะอาด ปราศจากไขมันให้ได้ film บางๆ ปลอ่ยให้แห้ง แล้ว fix ด้วยความร้อนอ่อนๆ เพื่อให้สิ่งป้ายติดแน่นกับสไลด์

9.2.2 การย้อมสิ่งส่งตรวจ

9.2.2.1 ย้อมด้วย Crystal violet นาน 30 วินาที ล้างน้ำ

9.2.2.2 ย้อมซ้ำด้วย Gram iodine 30 วินาที ล้างน้ำ

9.2.2.3 ล้างด้วย Acetone alcohol 1-2 ครั้ง

9.2.2.4 ย้อมทับด้วย Safranin 10 วินาที ล้างน้ำให้สะอาด ชับด้วยกระดาษซับให้แห้ง

9.2.3 นำมาตรวจดู ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 100

9.3 การรายงานผล

9.3.1 ให้บอกจำนวน WBC และ Bacteria โดยอาศัยหลักเกณฑ์ดังนี้

Rare ตรวจพบว่ามี Bacteria 0-1 cell/OPF

Few ตรวจพบว่ามี Bacteria 1-5 cell/OPF หรือ WBC 1-9 cell/LPF

Moderate ตรวจพบว่ามี Bacteria 6-30 cell/OPF หรือ WBC 10-25 cell/LPF

Numerous ตรวจพบว่ามี Bacteria > 30 cell/OPF หรือ WBC > 25 cell/LPF

9.3.2 ให้รายงานการติดสี Gram รูปร่างของแบคทีเรีย และการเรียงตัว

9.3.2.1 การติดสี

Gram Negative ติดสีแดง

Gram Positive ติดสีม่วงเข้ม

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 8/9

9.3.2.2 รูปร่าง

Cocci cluster

Cocci pairs

Cocci single

Coccobacilli

Diplococci

Bacilli

หมายเหตุ; สไลด์ที่ตรวจวิเคราะห์แล้วให้เก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน เพื่อการทวนสอบในภายหลัง

10. วิธีการควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพภายใน

การควบคุมการย้อมสีและคุณภาพของสีย้อม ให้นำเชื้อ *S. aureus*: ATCC 25923 และ *E.coli*: ATCC 25922 มาย้อมด้วยวิธีที่ใช้ ปฏิบัติอยู่ปัจจุบันแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อทดสอบคุณภาพของสี และคุณภาพของการย้อมสิ่งส่งตรวจ อาทิตย์ละ 1 ครั้ง

การควบคุมคุณภาพภายนอก

การควบคุมคุณภาพโดยองค์การภายนอกร่วมกับสำนักงานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 3 ครั้ง

11. สิ่งรบกวนการทดสอบ

-

12. หลักการของวิธีการคำนวณผล รวมทั้งความไม่แน่นอนของการวัด

-

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

	กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลลำพูน	WI-BAC-002
	วิธีปฏิบัติ (Work instruction)	
	เรื่อง การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยการ ย้อมสี Gram	
	ทบทวน/แก้ไขครั้งที่ 17	หน้า 9/9

13. คำอ้างอิงในคนปกติ

-

14. ขอบเขตของค่าของผู้ป่วยที่รายงาน

-

15. คำวิฤต

-

16. การรายงานและการแปลผลการทดสอบ

- เมื่อพบเชื้อแบคทีเรียให้รายงานการติดสี Gram รูปร่างของแบคทีเรีย และการเรียงตัว เช่น Gram Positive Cocci pairs, Gram Negative Bacilli หรือ Gram Negative Diplococci เป็นต้น
- เมื่อไม่พบเชื้อแบคทีเรียให้รายงาน Bacteria Not seen

17. ข้อควรระวังเพื่อความปลอดภัย

- ปฏิบัติตามหลักสากลในการปฏิบัติงานเกี่ยวกับโรคติดเชื้อ

18. สิ่งที่เป็นสาเหตุของความแปรปรวน

-

19. เอกสารอ้างอิง (Reference)

- SD-BAC-002 (คู่มือการตรวจทางจุลชีววิทยาคลินิก)
- SD-BAC-003 (คู่มือการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาจุลชีววิทยาคลินิก)
- SD-BAC-004 (การตรวจทางแบคทีเรียวิทยาและราวิทยา)

เอกสารนี้เป็นสมบัติของโรงพยาบาลลำพูน ห้ามนำออกไปใช้ภายนอก หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต