

การตรวจวิเคราะห์ GRAM STAIN, ACID FAST STAIN และ KOH PREPARATION

12 มกราคม 2569

จัดทำโดย
นางสกาไน เนตรภู
นักเทคนิคการแพทย์ ฝ่ายชันสูตรสารณสุข
โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชตะพานหิน

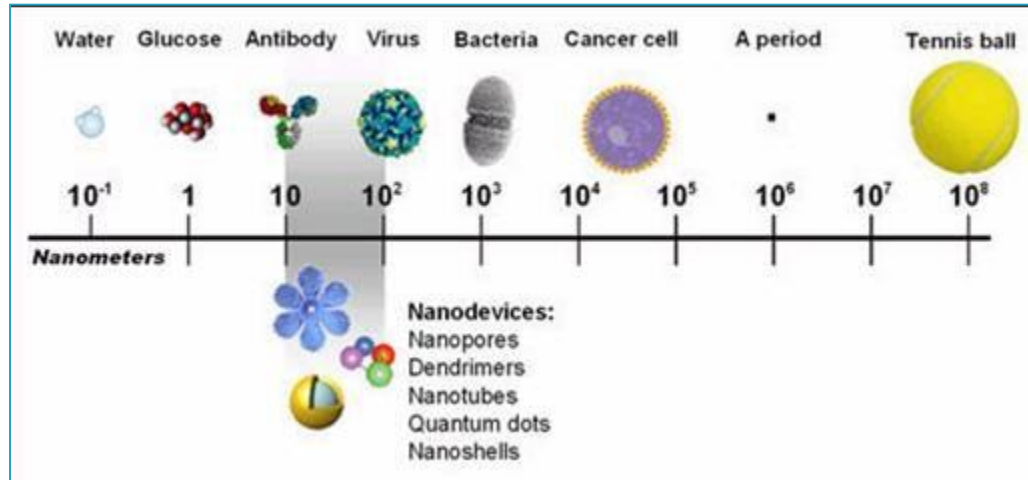
แบคทีเรีย

คืออะไร ???

แบคทีเรีย คือ จุลชีพชนิดเซลล์เดียว(unicellular) มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนมีลักษณะเหมือนร่างแหห่อหุ้มของเหลว(protoplasm) อยู่ภายในนิวเคลียส(nucleus) ของแบคทีเรียมีลักษณะของสาย DNA คู่ขดเป็นวงกลมโดยไม่มีผนังห่อหุ้ม DNA ไว้ พบได้ทุกหนทุกแห่งในโลก ในสภาพสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งในดิน ในน้ำ ในอากาศ พืช สัตว์ และในคน



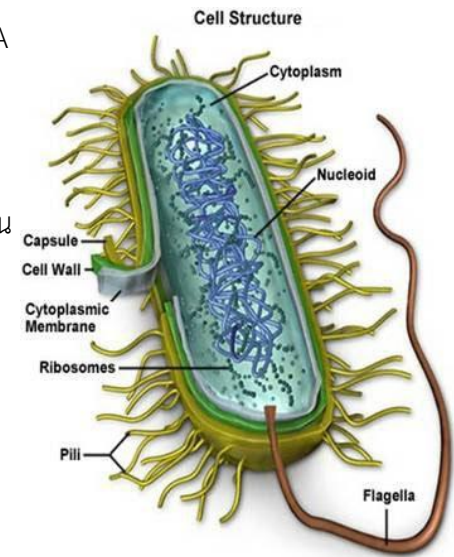
ขนาดของแบคทีเรีย



- ❖ แบคทีเรียมีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ขนาดเล็กมากประมาณ 0.2 ไมครอน จนถึงขนาดใหญ่ประมาณ 5ไมครอน โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 0.2-1.5 ไมครอน
- ❖ แบคทีเรียที่ใหญ่ที่สุด *Thiomargarita namibiensis* 750 ไมครอน (0.75 mm)แบคทีเรียที่เล็กที่สุด *genus Mycoplasma* 0.3 ไมครอน

โครงสร้างของแบคทีเรีย

1. **cytoplasmic membrane** (เยื่อหุ้มเซลล์) เป็นเยื่อ 2 ชั้น ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic) ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด 20-30% โปรตีน 50-70% และคาร์โบไฮเดรตเล็กน้อย ส่วนของลิปิดและโปรตีนมีการเลื่อนไหลไปมาได้ (fluidity)
2. **Cytoplasmic matrix** มีลักษณะเป็นวุ้น ประกอบด้วย น้ำ 70% ประจุสารอนินทรีย์ตัวกลางต่างๆของกระบวนการเมตาโบลิซึม DNA granule (สะสมสารอาหาร โปรตีน)
3. **Ribosomes** เป็นเม็ดเล็กๆ ขนาด 15-20 nm กระจายทั่วไปอิสระในเซลล์ประกอบด้วย RNA 60-90% โปรตีน 10-40% จำนวนขึ้นกับความต้องการสร้างโปรตีน
4. **Nucleoid** ประกอบด้วยDNA เส้นเดี่ยวหรือคู่ปลายสองข้างเชื่อมกันยาวประมาณ 500 เท่าของเซลล์DNA ของแบคทีเรียอยู่ในนิวคลีอยด์หรือ bacterial chromosome
5. **Cell wall** (ผนังเซลล์) ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบเซลล์ที่อยู่ระหว่างแคปซูลและเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น mycoplasma มีโครงสร้างนี้ ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของผนังเซลล์คือ ช่วยให้เซลล์คงรูปไว้ป้องกันและรักษาความดันภายในเซลล์ เป็น precursor ในขบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ เป็นต้น
6. **Capsules** ลักษณะเป็นวุ้น รูปร่างไม่แน่นอนไม่ติดสีแกรม ความหนาแตกต่างกันตามชนิดแบคทีเรีย
7. **Pili** มีส่วนร่วมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในแบคทีเรียโดยอาศัยF-pili(sex pili) และมีคุณสมบัติเป็น antigen Fimbriae มีลักษณะเป็นขนละเอียดเล็กๆ จำนวนมาก ไม่มีหน้าที่ในการเคลื่อนที่
8. **Flagella** ลักษณะเป็นเส้นยาวคล้ายเส้นด้าย ความยาว 1-70 ไมโครเมตร ยื่นออกมานอกผนังเซลล์มีในแบคทีเรีย spiral เกือบทั้งหมด



ประเภทของแบคทีเรีย

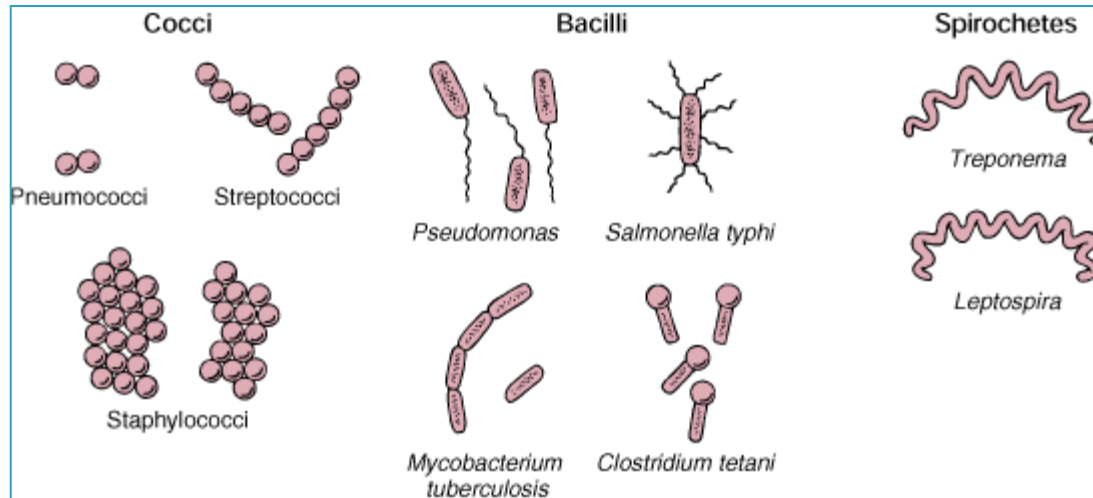
❖ แบ่งตามการย้อมติดสีแกรม (Gram's stain)

มีได้สองลักษณะคือพวกที่ติดสีแกรมบวก (Gram positive) และที่ติดสีแกรมลบ (Gram negative) แต่บางชนิดสามารถติดสีทั้งสองเรียกว่า Gram variable ซึ่งเกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย



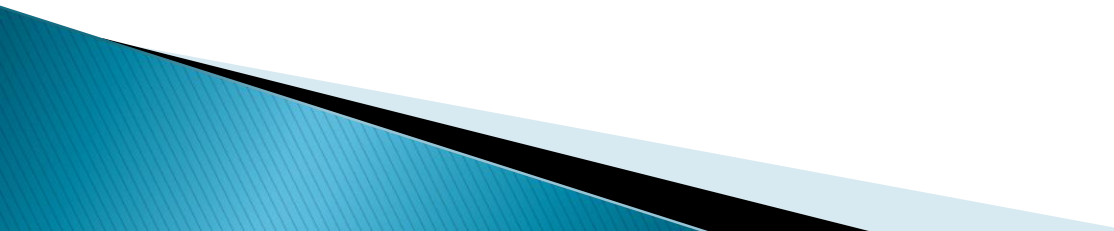
รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

1. ทรงกลม (coccus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปกลม หรือไขอาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆหรือต่อกันเป็นสายโซ่หรืออยู่กันเป็นกลุ่ม
2. ทรงกระบอก (bacillus) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งอาจเป็นแท่งสั้น หรือแท่งยาว
3. แบบเกลียว (spirillum) เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนโค้งงอ



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

แบ่งตามการติดสี รูปร่างและการเรียงตัวดังนี้

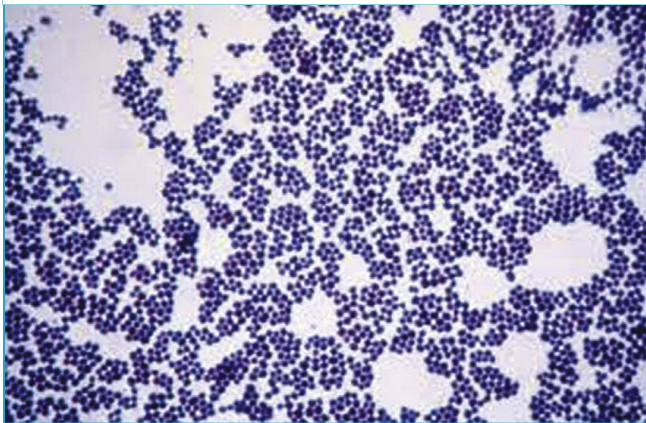
1. Gram Positive cocci in irregular cluster, single, pair and short chains
 2. Gram positive in chain
 3. Gram positive diplococci
 4. Gram Positive bacilli
 5. Gram positive Bacilli with terminal spore
 6. Gram positive Bacilli with subterminal and central spore
 7. Gram positive bacilli in chinese letter or palisade (with metachromatic granule)
 8. Gram negative diplococci
 9. Gram negative coccobacilli
 10. Gram Negative bacilli
 11. Gram negative bacilli with bipolar staining
 12. Gram variable Bacilli with pleomorphic appearance
- 

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

1. Gram Positive cocci in irregular cluster, single, pair and short chains

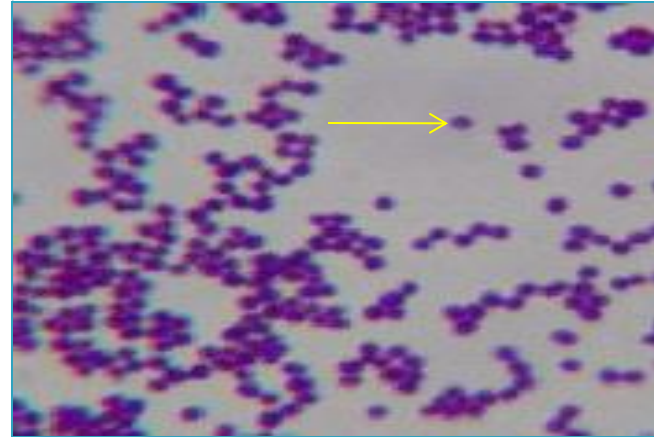
ติดสีม่วงมีลักษณะทรงกลม(coccus) หรืออาจจะมีรูปร่างที่ผิดแปลกไปบ้างเช่น กลมรีหรือคล้ายเม็ดถั่ว เรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มคล้ายรวง
องุ่นเรียก cluster หรืออยู่เดี่ยวๆ เรียก single

Gram Positive cocci in irregular cluster



ที่มา <https://sites.google.com/site/biologicalproject2556/unit2/bio4>

Gram Positive cocci in single



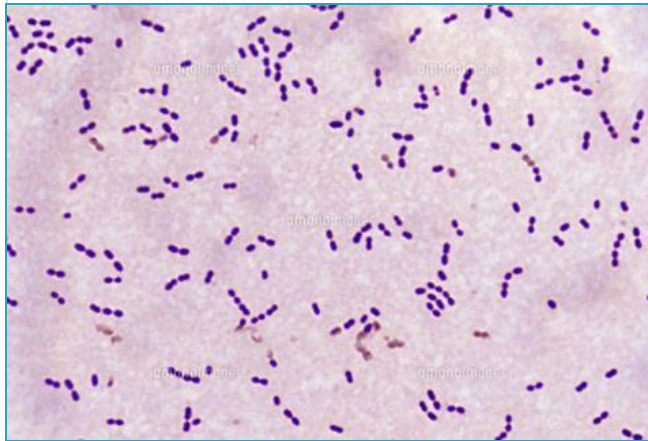
<https://www.studyblue.com/notes/note/n/micro-2400-study-guide-2014-15-sassinella/deck/14833607>

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

1. Gram Positive cocci in irregular cluster, single, pair and short chains (ต่อ)

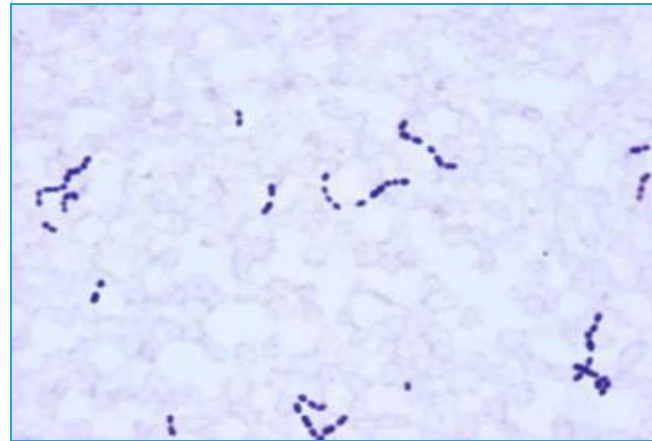
ติดสีม่วงมีลักษณะทรงกลม(coccus) เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ

Gram Positive cocci in pair



<https://www.pinterest.com/pin/499969996117207785>

Gram Positive cocci in short chains



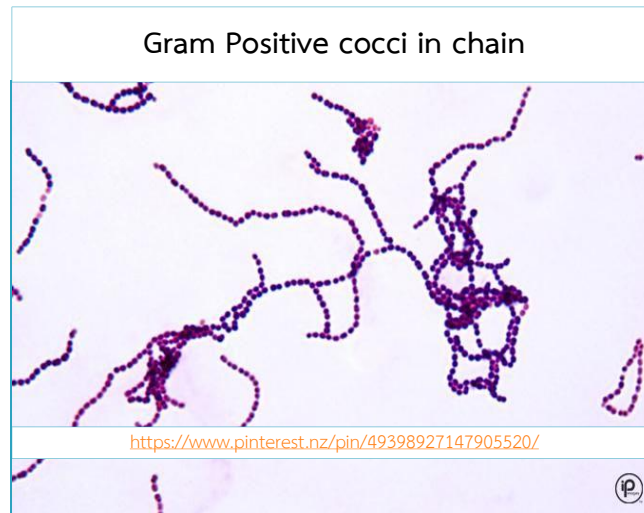
<https://www.studyblue.com/notes/note/n/intro-gram-stain-images/deck/7402882>

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

2. Gram positive in chain

ติดสีม่วง รูปร่างทรงกลมเรียงตัวเป็นสายยาว

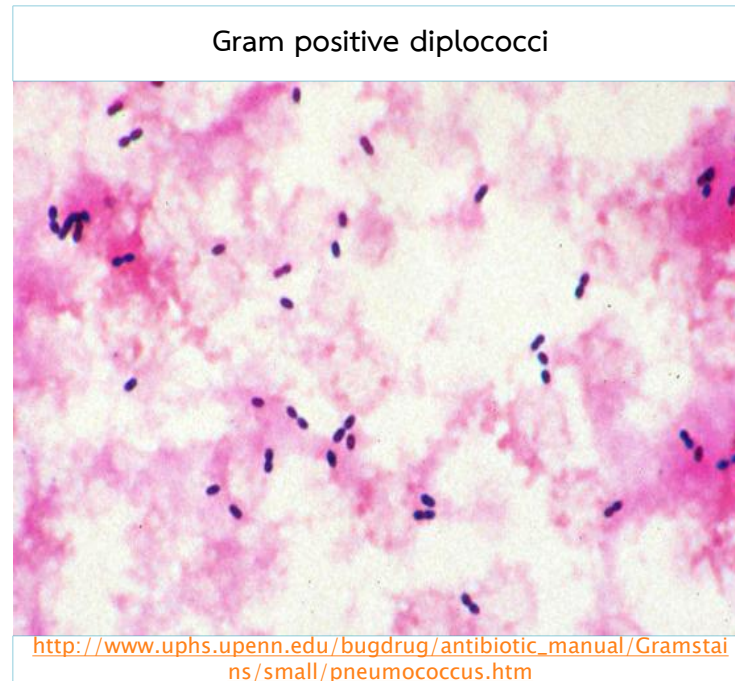
** ลักษณะดังกล่าว อาจสอดคล้องกับ โรคติดเชื้อทางระบบหายใจคือเชื้อ (Streptococcus group A) เป็นเชื้อก่อโรค scarlet fever และ *Streptococcus suis* เชื้อก่อโรคโรคไข้หูดับ **



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

3. Gram positive diplococci

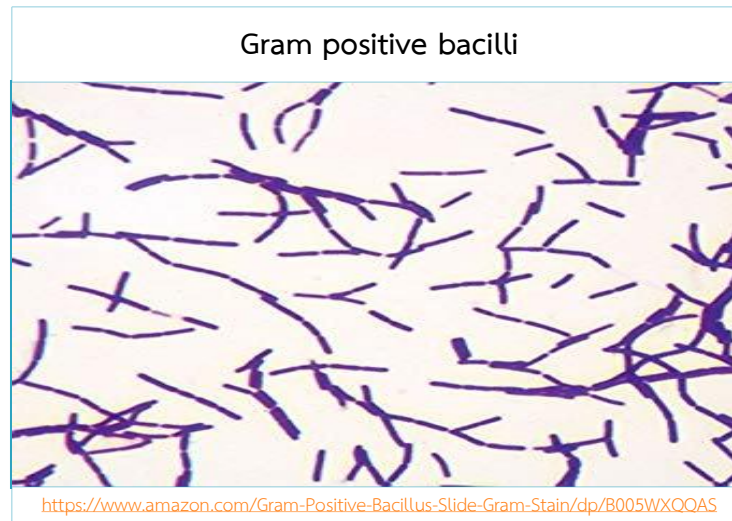
ติดสีม่วง เซลล์มีลักษณะกลม 2 เซลล์เรียงติดกัน



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

4. Gram Positive bacilli

ติดสีม่วงลักษณะรูปแท่ง



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

5. Gram positive Bacilli with terminal spore

ติดสีม่วงเป็นแท่ง มีspore อยู่ส่วนปลาย มีลักษณะคล้ายไม้แบด

Gram positive Bacilli with terminal spore



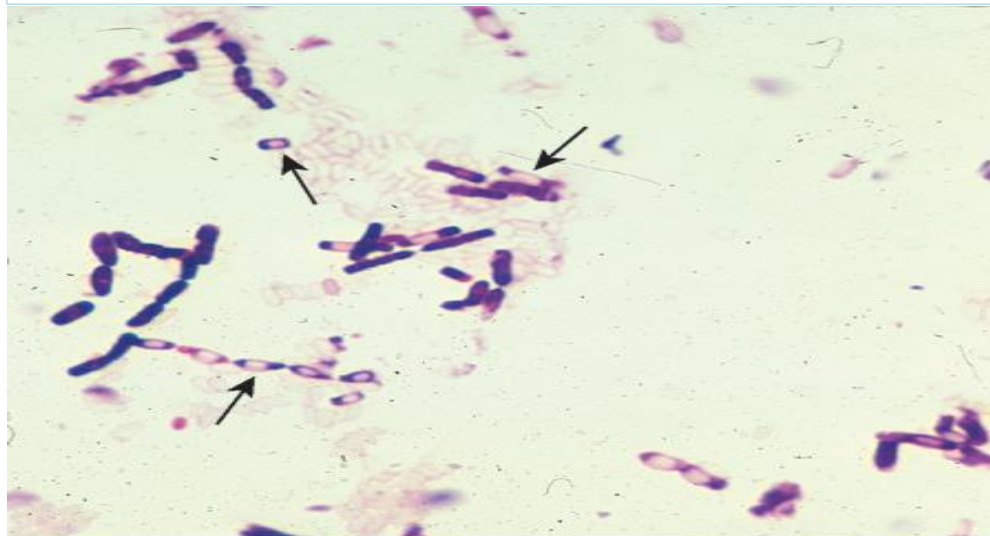
<http://www.medical-labs.net/clostridium-characteristics-2884/>

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

6. Gram positive Bacilli with subterminal and central spore

ติดสีม่วงเป็นแท่ง มีspore อยู่ส่วนตรงกลางและเกือบถึงส่วนปลาย

Gram positive Bacilli with subterminal and central spore



<https://accesspharmacy.mhmedical.com/books.aspx?view=library>

berg's

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

7. Gram positive bacilli in chinese letter or palisade (with metachromatic granule)

ติดสีม่วง รูปร่างแท่ง การเรียงตัวเป็นซี้ริ้วหรือคล้ายตัวอักษรภาษาจีน

Gram positive bacilli in chinese letter or palisade
(with metachromatic granule)

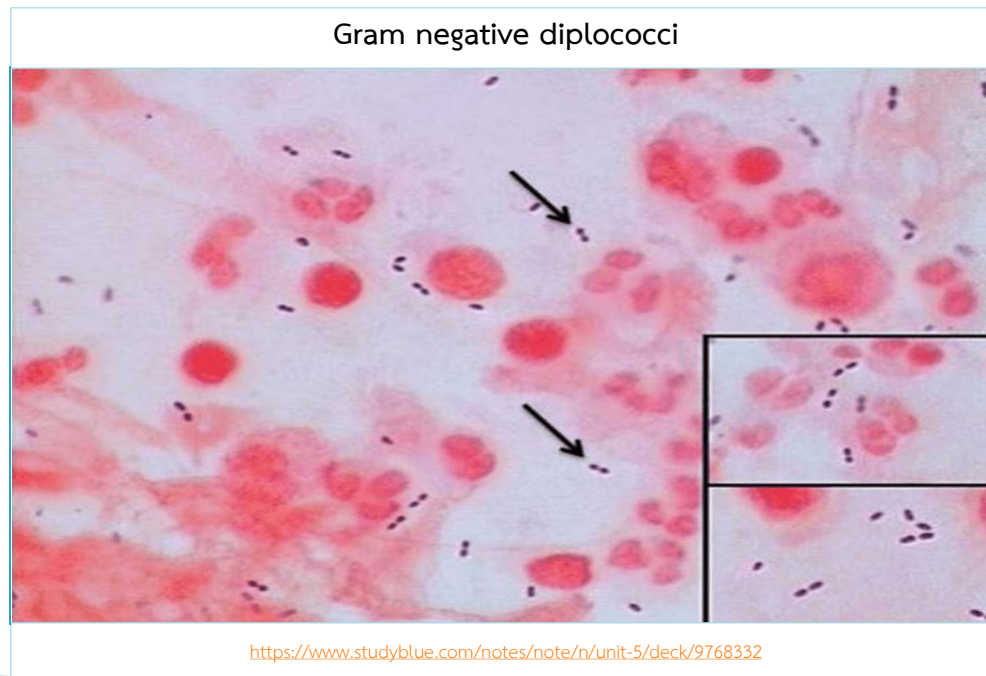


<https://www.studyblue.com/notes/note/n/unit-5/deck/9768332>

การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

8. Gram negative diplococci

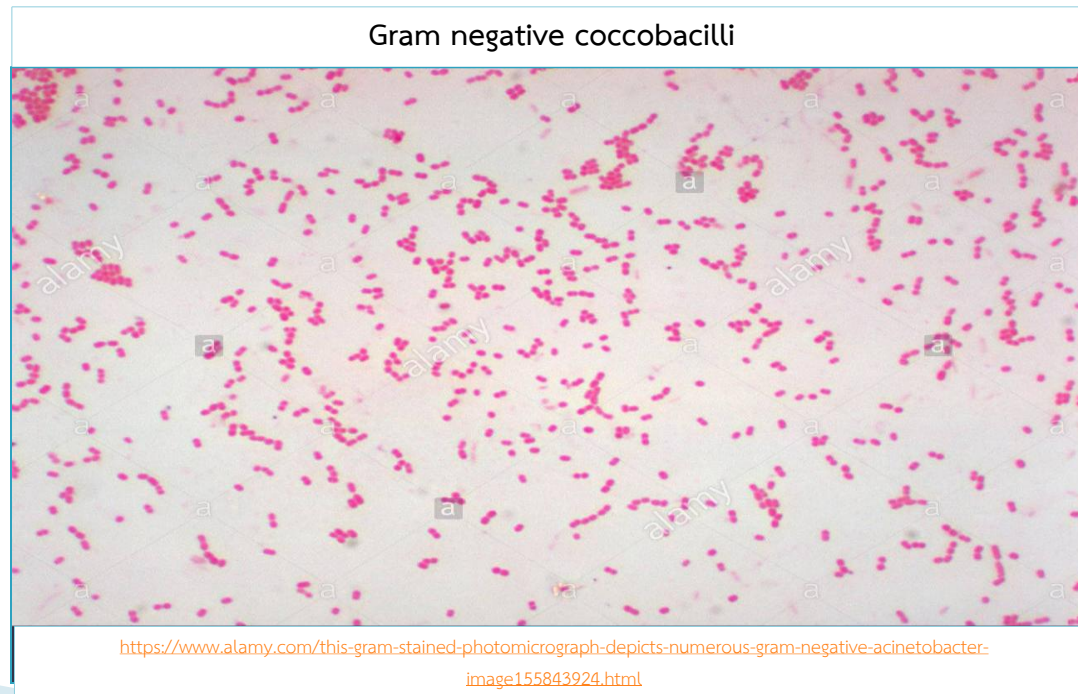
ติดสีแดง ลักษณะกลมเรียงตัวติดกัน 2 เซลล์



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

9. Gram negative coccobacilli

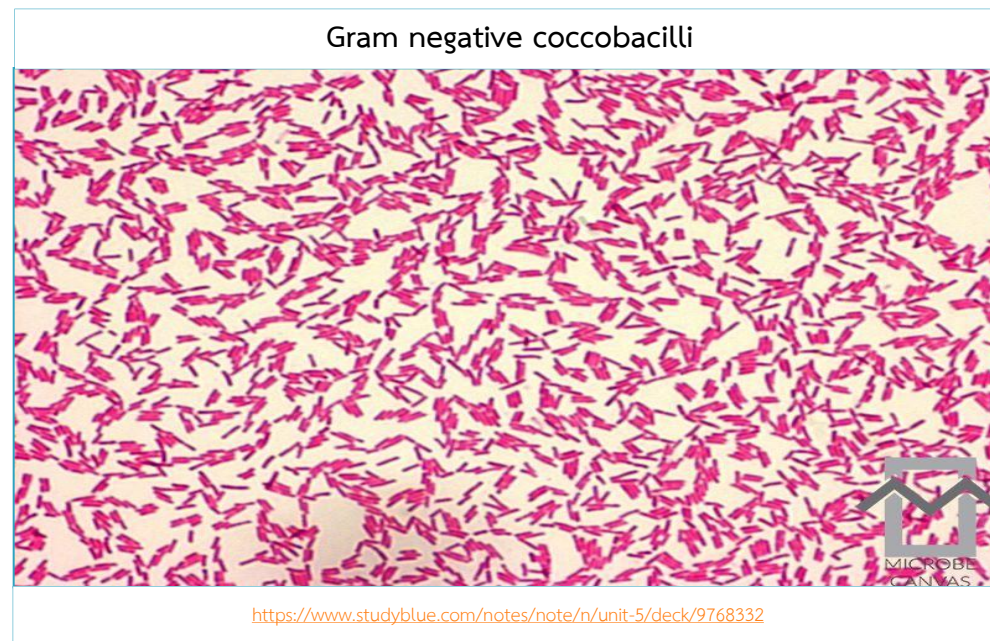
ติดสีแดง รูปร่างจะเป็นแท่งสั้นๆ ดูคล้ายทั้งcocci ทั้งbacilliจึงเรียกว่า (Coccobacilli)



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

10. Gram Negative bacilli

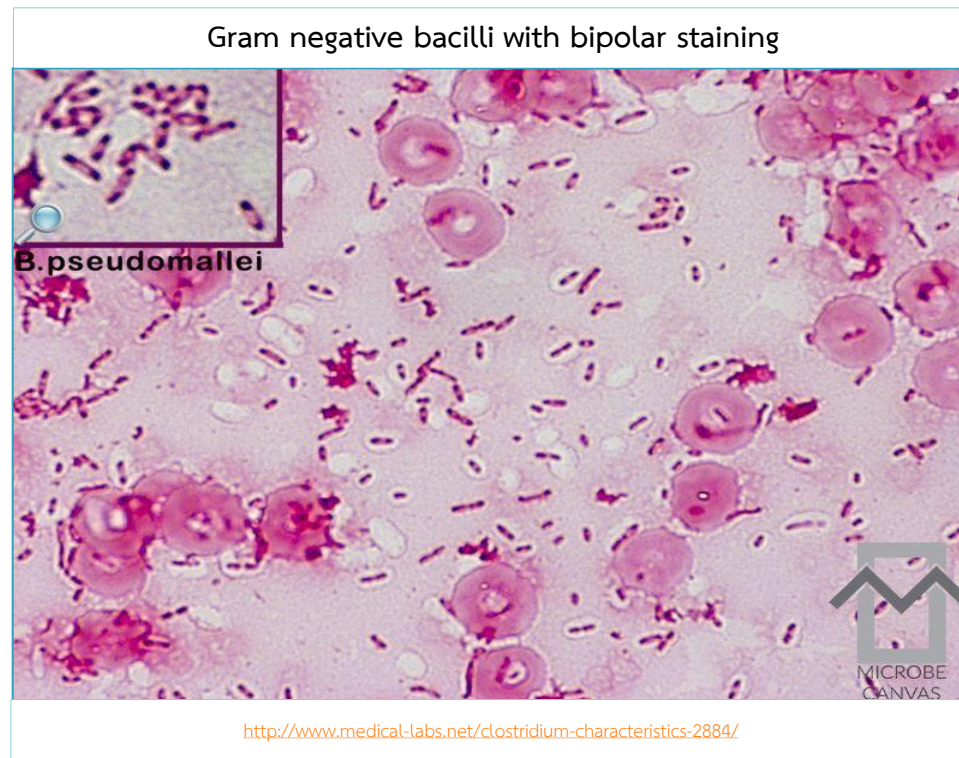
ติดสีแดง รูปร่างเป็นแท่ง



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

11. Gram negative bacilli with bipolar staining

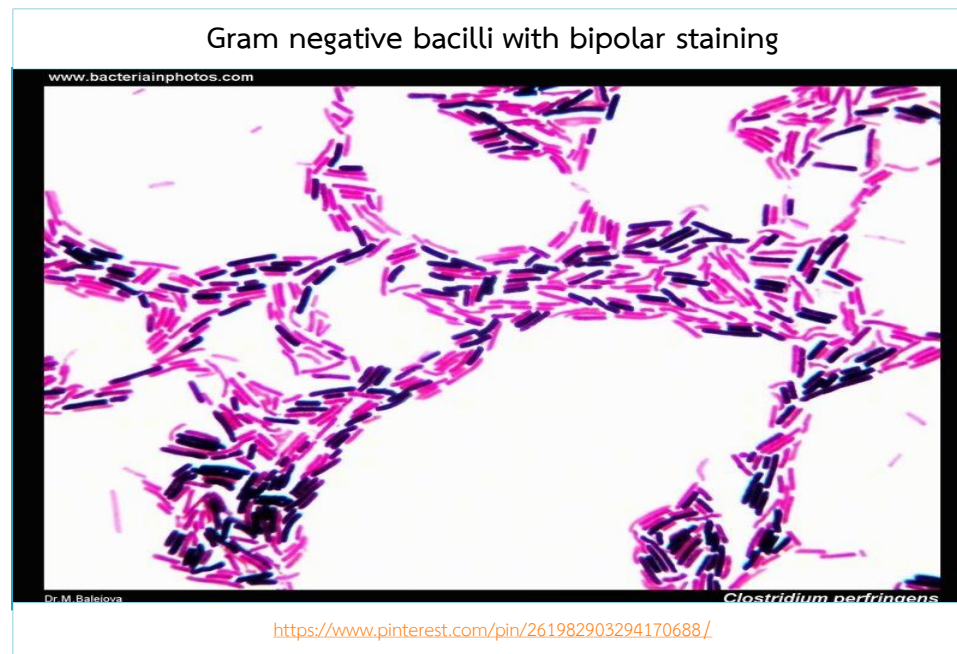
ติดสีแดงหัวท้าย รูปร่างแท่ง



การติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (Bacterial Morphology)

12. Gram variable Bacilli with pleomorphic appearance

ติดสีม่วงและสีแดง รูปร่างแท่ง



การย้อมสี Gram stain

การย้อมสี

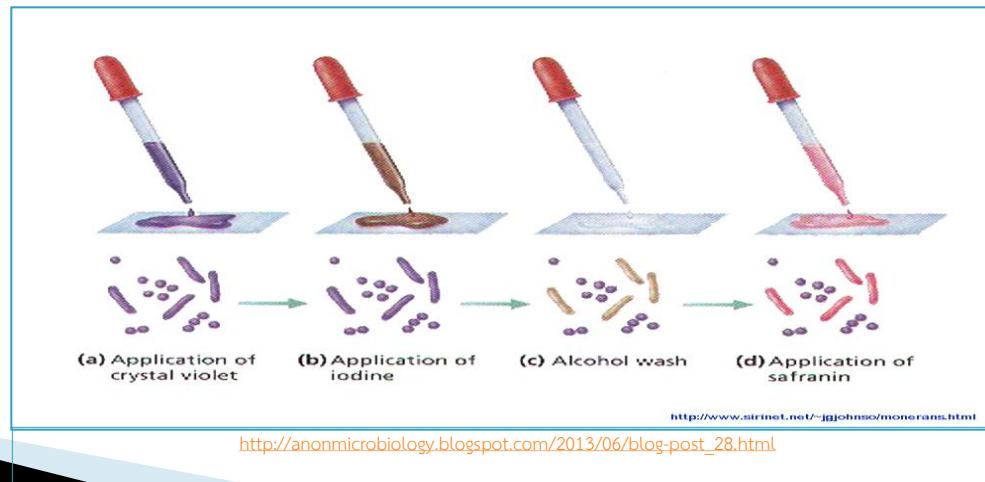
เป็นวิธีการอย่างหนึ่งง่าย และสะดวกรวดเร็วในการศึกษาแบคทีเรียการย้อมสีจะช่วยให้เห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นการย้อมสีนี้อาศัยหลักที่สำคัญคือ

1. เซลล์แบคทีเรียที่ย้อมสีจะสังเกตเห็นรูปร่างได้ชัดเจนกว่าแบคทีเรียที่ไม่ย้อมสี
2. โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดต้องใช้สีย้อมต่างกันจึงจะเห็นได้ชัดเจน

การย้อมสี Gram stain

หลักการ

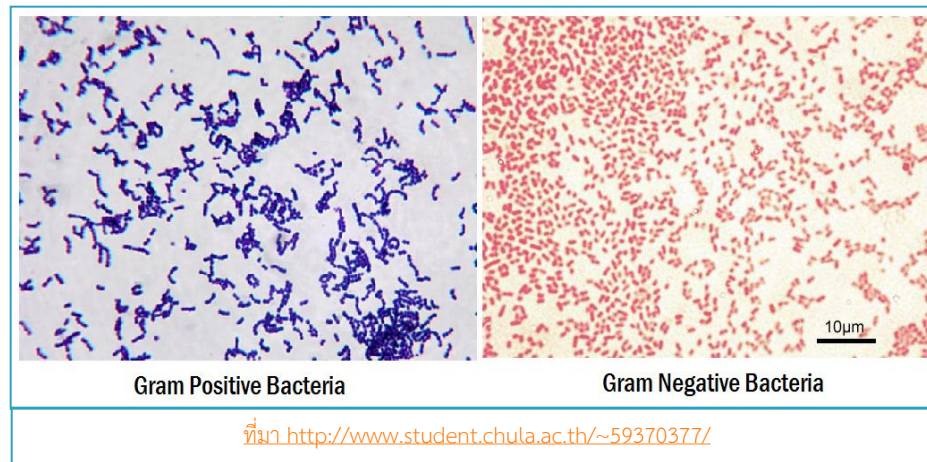
เมื่อย้อมด้วย crystal violet สีจะซึมเข้าไปใน cytoplasm ของแบคทีเรีย และเมื่อย้อมทับด้วย gram iodine ก็จะไปจับกับ crystal violet เกิดเป็น crystal iodine complex ซึ่งมีโมเลกุลโตขึ้นจึงไม่สามารถหลุดออกจากตัวแบคทีเรียได้ เมื่อล้างด้วย alcohol หรือ alcohol acetone ซึ่งเป็นสารละลายไขมันจะไปละลายไขมันที่มีอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบ มีไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างในลักษณะเดียวกันรูที่อยู่ที่ผนังเซลล์ ของแบคทีเรียแกรมลบ ย่อมโตกว่ารูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก crystal iodine complex จึงหลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่หลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างด้วย alcohol อย่างถูกต้อง แต่ถ้าล้างมากเกินไปย้อมทำให้ complex ในแบคทีเรียแกรมบวก หลุดออกด้วย ในทำนองเดียวกัน ถ้าล้างน้อยเกินไป complex ในแบคทีเรียแกรมลบก็ไม่หลุดออกจึงทำให้ติดสีผิด เมื่อย้อมทับด้วย safranin จะไปติดแบคทีเรียที่ไม่มีสีอยู่ทำให้เป็นสีแดง คือแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียที่มีสีติดอยู่แล้วจะไม่ติดสี safranin จึงเห็นเป็นสีม่วง คือแกรมบวก



วิธีการย้อมสี Gram stain

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นหลักฐานตามระบบประกันคุณภาพและใช้เป็นคู่มือการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบสำหรับการตรวจ Gram stain จากสิ่งส่งตรวจให้แก่ผู้ป่วยเป็นการทั่วไป ซึ่งทำให้การปฏิบัติงานมีคุณภาพและยังเป็นประโยชน์ให้สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้



วิธีการย้อม Gram stain

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. Class II biological safety cabinet
3. สไลด์ผ้า
4. ดินสอ
5. ไม้เขี่ยตัวอย่าง



วิธีการย้อมสี

วิธีการย้อมสี Gram stain

1. ตรวจสอบ ชื่อ-สกุล ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจกับใบส่งตรวจว่าตรงกันหรือไม่
2. เขียนชื่อ-สกุล และ HN คนไข้ลงบนแผ่นสไลด์ผ้าให้ถูกต้องตรงกลับสิ่งส่งตรวจ
3. ป้ายสิ่งส่งตรวจบนสไลด์ให้ได้ film บาง ๆ ปล่อยให้แห้งแล้ว fix ด้วยความร้อน อ่อน ๆ เพื่อให้สิ่งที่ป้ายไว้ติดแน่นกับสไลด์
4. หยดน้ำยา crystal violet 1 นาที่ แล้วล้างน้ำ
5. หยดน้ำยา iodine 1 นาที่ แล้วล้างน้ำ
6. เอียงสไลด์แล้วหยด Decolorizer ล้างน้ำทันที
7. หยด Safraninทิ้งไว้ 1 นาที่ แล้วล้างน้ำ
8. เมื่อสไลด์แห้งตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการย้อมสี

สีและสารละลายที่ใช้	แบคทีเรียแกรมบวก	แบคทีเรียแกรมลบ
1. Crystal violet	เซลล์ติดสีม่วง	เซลล์ติดสีม่วง
2. สารละลายไอโอดีน	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ Crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ในเซลล์ เซลล์ยัง ติดสีม่วง	สารละลายไอโอดีนจะรวมกับ Crystal violet เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เซลล์ยัง ติดสีม่วง
3. Ethyl alcohol	ไฮโดรฟอบิกและผนังเซลล์จะสูญเสียน้ำจึงเกิดการเหี่ยวหรือหดตัวทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดเล็กสารประกอบของสีมีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถละลายออกมาได้เซลล์จึง ติดสีม่วง	สารพอลิปิดที่ผนังเซลล์ถูกละลายออกไปทำให้รูของผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นสารประกอบของสีจึงสามารถละลายออกจากเซลล์ได้ เซลล์ ไม่ติดสี
4. Safranin O	เซลล์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีนี้เซลล์ ติดสีม่วง ตามเดิม	เซลล์ ติดสีแดง ของ Safranin O

ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (Quality control procedures)

❖ Internal Quality Control

- ใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น Gram Positive control
- ใช้ *E.coli* เป็น Gram Negative control
- ทำ IQC เดือนละ 1 ครั้ง

❖ External Quality Control

- EQC ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 3 ครั้ง เหน็จผ่านการประเมิน ตรงตามค่าเป้าหมายที่กำหนด



ที่มา <https://spirituality.ru/th/samorazvitie/kakie-prichiny-povyshennyh-leikocitov-v-mazke-u-zhenshchin-mazok-na.html>

สิ่งรบกวนและปฏิกิริยาข้าม (Interferences and cross reaction)

- ❖ การ Smear ต้องทำให้ได้ film ที่สม่ำเสมออย่าให้หนาเกินไป จะทำให้ Decolorize ยาก และทำให้ Bacteria ติดสีผิดพลาด
- ❖ ไม่ fix Slide ขณะที่สิ่งส่งตรวจยังไม่แห้งดี เพราะทำให้ cell bacteria พองทำให้รูปร่างผิดไปจากเดิม
- ❖ การย้อมสีต้องใส่สีให้ท่วม Slide อย่าปล่อยให้แห้ง เพราะจะทำให้มีตะกอนสีทำให้อ่านผลยาก
- ❖ การ Decolorize มากจะทำให้ Bacteria ติดสีแกรมลบหมดและการ Decolorize น้อยเกินไปจะทำให้ Bacteria ติดสีแกรมบวกหมด

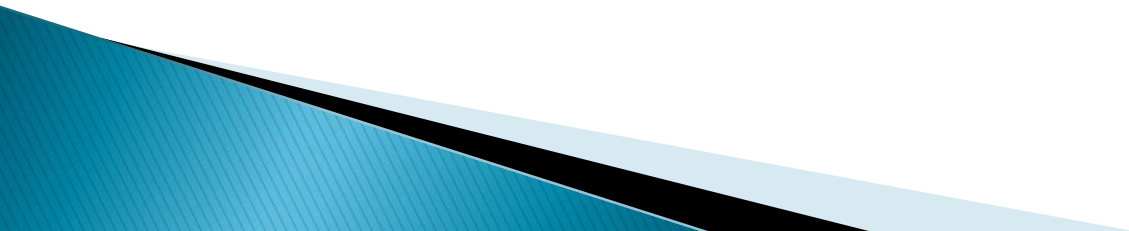
รายงานผลการทดสอบ

ควรรายงานการติดสีแกรม รูปร่าง และการเรียงตัว เช่น Gram positive cocci in chain, Gram negative bacilli และ Gram negative bacilli with bipolar staining เป็นต้น

การรายงานปริมาณของเชื้อและเซลล์

Rare	(<1 per oil field)
Few	(1-5 per oil field)
Moderate	(5-30 per oil field)
Numerous	(>30 per oil field)

ACID FAST STAIN



Acid fast stain

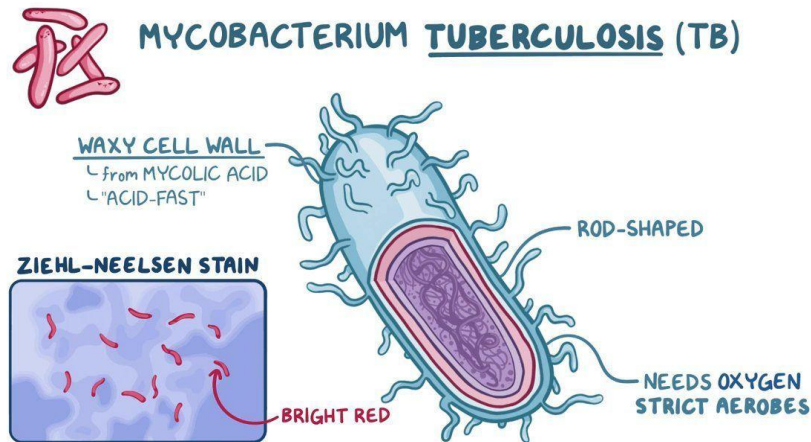
วัตถุประสงค์

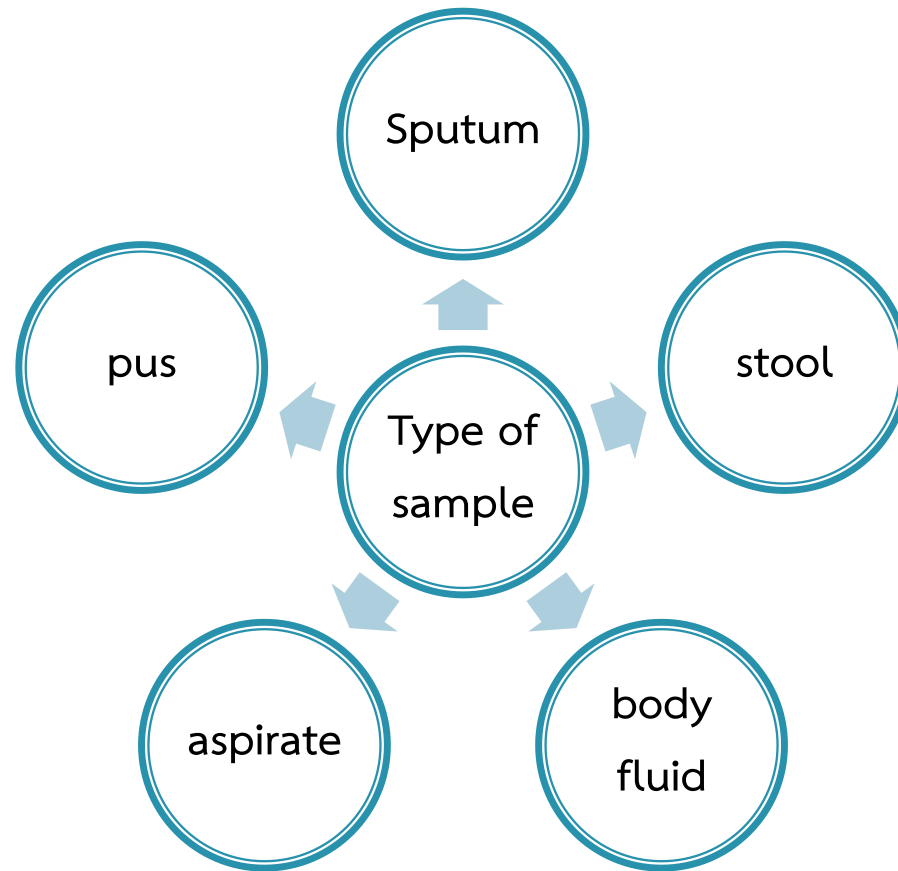
เพื่อใช้เป็นหลักฐานตามระบบประกันคุณภาพและใช้เป็นคู่มือการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบสำหรับการย้อมสี AFB โดยวิธี Kinyoun cold stain เพื่อวินิจฉัยวัณโรคให้แก่ผู้ป่วยเป็นการทั่วไป ซึ่งทำให้การปฏิบัติงานมีคุณภาพและยังเป็นประโยชน์ให้สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

Acid fast stain

หลักการ

เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) มีคุณสมบัติพิเศษคือ เป็นเชื้อทนกรดจึงเรียกว่า Acid fast bacilli ทั้งนี้ก็เพราะผนังเซลล์ประกอบไปด้วยกรดไขมัน สูงถึง 60 % ของน้ำหนักแห้งทำให้ยอมติดสียากแต่เมื่อติดสีแล้วจะล้างออกยาก แม้จะใช้ Acid alcohol ก็ตาม เชื้อจะติดสีแดงของ Carbol Fuchsin ขณะที่พื้นจะติด สีน้ำเงินของ Methylene blue ที่ใช้เป็น counter stain





การเตรียมผู้ป่วย(Patient preparation)

- ตรวจสอบชื่อ-สกุล และ HN ในใบนำส่งและสิ่งส่งตรวจให้ตรงกันผู้ป่วย
- ทำการเก็บเสมหะในบริเวณที่เหมาะสม
- วิธีการเก็บเสมหะ ผู้ป่วยเปิดกล่องภาชนะเก็บเสมหะ ไอลึกๆ (สูดหายใจเข้าลึกๆกลั้นหายใจชั่วครู่ออกแรงไอให้เสมหะขึ้นมาจากหลอดลม) เมื่อขากได้แล้ว ให้ยกปากตลับเก็บเสมหะขึ้นชิดริมฝีปากล่าง ค่อยๆ ปล่อยให้เสมหะไหลลงตลับเสมหะ
- ถ้าเก็บไม่ได้ เช่น ได้เฉพาะน้ำลาย ให้ผู้ป่วยพยายามเก็บใหม่
- ปิดฝาเก็บเสมหะให้แน่นพอดี
- ล้างมือให้สะอาด
- นำส่งห้องปฏิบัติการทันที

ประเภทของภาชนะและสารเติมแต่ง

(Type of container and additives)

- กรณีส่งเป็นสไลด์ ให้ใช้สไลด์ผ้า โดยเขียน ชื่อ-สกุล ผู้ป่วย แล้วป้ายสิ่งส่งตรวจบางๆลงบนสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้งใส่ถุงพลาสติกหรือภาชนะที่ปิดมิดชิดเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรค
- กรณีส่งเป็นสิ่งส่งตรวจให้ใส่ภาชนะปลอดเชื้อปิดฝาให้มิดชิด ห้ามใส่ใน transport media หรือภาชนะอื่นที่ไม่ sterile

เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี

(Required equipment and additives)

➤ เครื่องมือ

- Class II biological safety cabinet
- กล้องจุลทรรศน์
- สไลด์ผ้า
- ดินสอ
- ไม้เขี่ยตัวอย่าง

➤ สารเคมี

- น้ำยาและสีย้อม AFB

สิ่งแวดล้อมและการควบคุมความปลอดภัย (Environmental and safety controls)

- สวมถุงมือmask และเสื้อกาวน์ทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน
- ปฏิบัติงานภายใต้ BSC Class II
- ให้ปฏิบัติตามคู่มือความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ(SP-LAB-17)

ขั้นตอนของกระบวนการงาน

(Procedural steps)

- ตรวจสอบชื่อ-สกุล และ HN ในใบนำส่ง และสิ่งส่งตรวจให้ตรงกัน
- ลงทะเบียนรับสิ่งส่งตรวจในสมุดบันทึก TB 04
- เขียนหมายเลขสิ่งส่งตรวจลงบนใบส่งตรวจ และแผ่นสไลด์ให้ตรงกัน
- หักปลายไม้สำหรับเขียนสิ่งส่งตรวจเล็กน้อย
- เขียนสิ่งส่งตรวจ นำมาป้ายบนสไลด์โดยวนเป็นก้นหอย
- smear slide ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไป fixed โดยการผ่านเปลวไฟ 3 – 4 ครั้ง
- หยดkinyoun carbolfuchsin ลงไปให้ท่วม slideแล้วทิ้งไว้นาน5 นาที แล้วล้างน้ำ
- หยดacid alcohol จนsmear มีสีใสแล้วล้างน้ำ และล้างออกด้วยน้ำสะอาด
- หยดmethyleneblue นาน 1นาที และล้างน้ำตากสไลด์ให้แห้ง แล้วนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (Quality control procedures)

➤ Internal Quality Control

- ทำ IQC สีย้อมเดือนละ 1 ครั้ง หรือทุกครั้งที่เปลี่ยน Lot. น้ำยา และบันทึกในแบบฟอร์มประเมินการย้อมสี AFB (F-LAB-019)
- AFB Positive Control : *Mycobacterium tuberculosis* (Sputum AFB Positive)
- AFB Negative Control : Sputum AFB Negative

➤ External Quality Control

- EQC กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 ครั้ง/ ปีครั้ง เภณต์ผ่านการประเมิน ตรงตามค่าเป้าหมายที่กำหนด

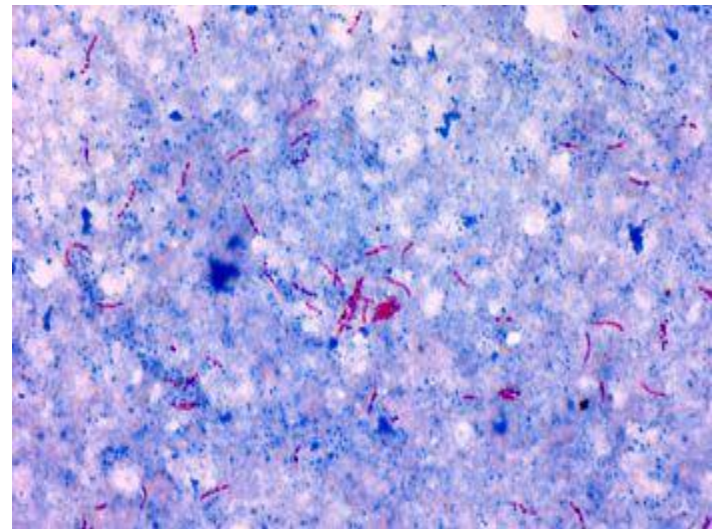
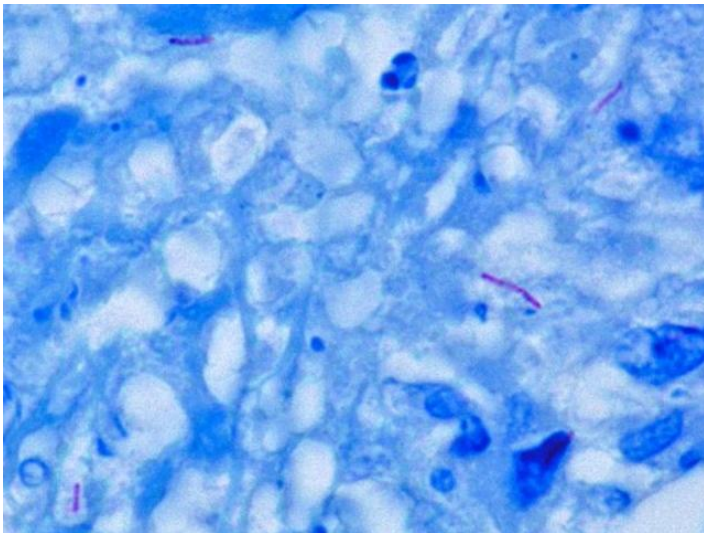
การรายงานผล AFB

จำนวนเชื้อที่พบ	ผลการตรวจ	Grading	จำนวนวงกล้องที่ตรวจ (อย่างน้อย)
0 AFB/ 100 วงกล้อง	Not seen	-	100
1-9 AFB/ 100 วงกล้อง	Positive	นับจำนวนที่พบ	100
10-99 AFB/ 100 วงกล้อง	Positive	1+	100
1-10 AFB/ วงกล้อง	Positive	2+	50
>10 AFB/ วงกล้อง	Positive	3+	20

ค่าวิกฤต/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม
(Alert/critical values,where appropriate)

➤ ตรวจพบ AFB ใน Body fluid

AFB Positive



การตรวจเชื้อรา (KOH PREPARATION)

วัตถุประสงค์ของการทดสอบ

(Purpose of the examination)

เพื่อใช้เป็นหลักฐานตามระบบประกันคุณภาพและใช้เป็นคู่มือการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบสำหรับการตรวจหาเชื้อรา (KOH preparation) ของห้องปฏิบัติการให้แก่ผู้ป่วยเป็นการทั่วไป ซึ่งทำให้การปฏิบัติงานมีคุณภาพและยังเป็นประโยชน์ให้สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

หลักการ

น้ำยา 10-30% Potassium hydroxide จะช่วยย่อยโปรตีน ไขมันและโพลีแซคคาไรด์ หรือเคอราติน ในสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้การอังไฟจะทำให้เคอราตินละลายได้เร็วขึ้น ทำให้สามารถมองเห็นเชื้อราได้ ชัดเจนเมื่อดูกล้องจุลทรรศน์

ประเภทของกลุ่มตัวอย่าง (Type of sample)

- ฝีหนอง เส้นผม ขน เล็บ เยื่อหู (Oral thrush, Vaginal thrush)



เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี

(Required equipment and additives)

- สไลด์ผ้า
- ใบมีดผ่าตัดปราศจากเชื้อเบอร์ 15
- Cover slip
- กล้องจุลทรรศน์

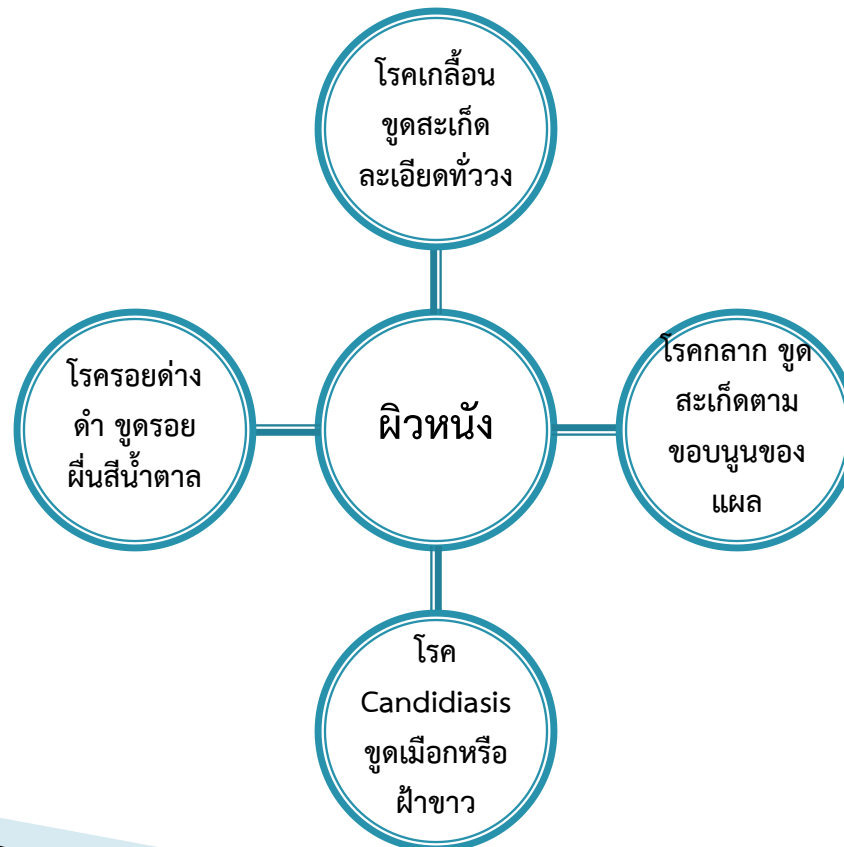
ขั้นตอนของกระบวนการงาน (Procedural steps)

การเก็บสิ่งส่งตรวจ

ให้ทำความสะอาดแผลหรือรอยโรคด้วย 70% alcohol เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก เครื่องสำอาง ยา รวมถึงเชื้อที่เป็น normal flora จนแน่ใจว่าตัวอย่างที่เก็บมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อรามากขึ้น

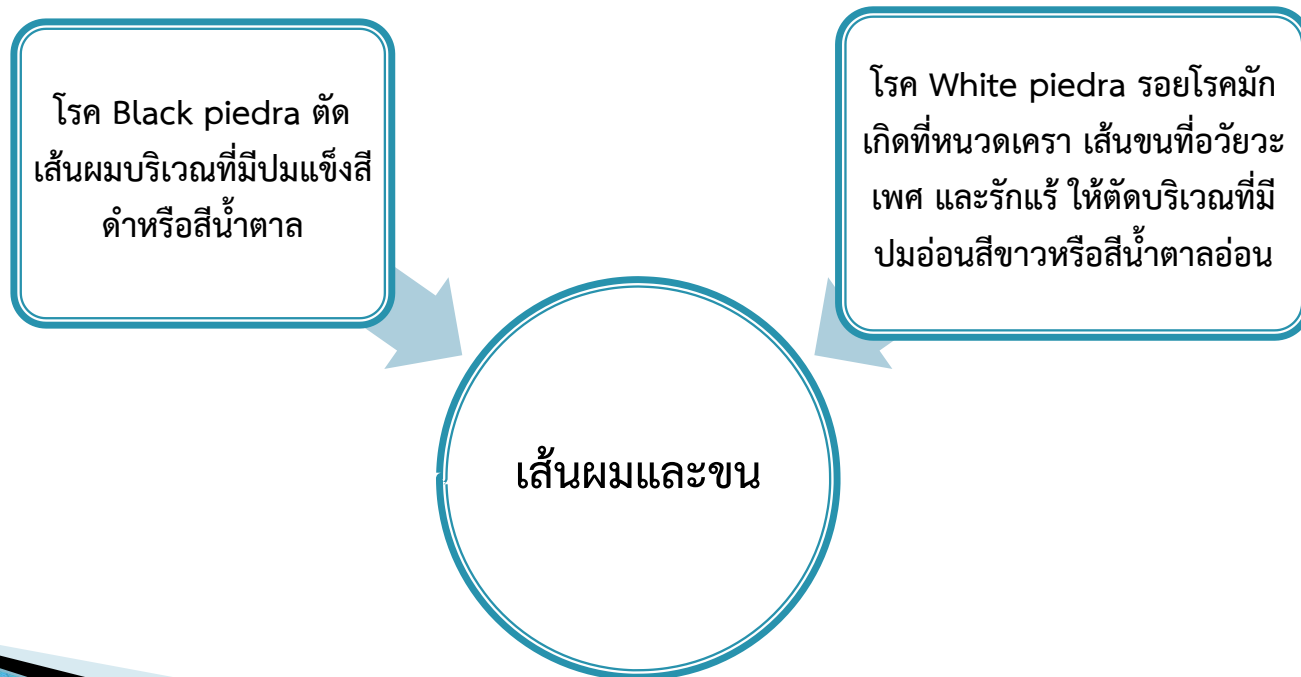
ขั้นตอนของกระบวนการงาน (Procedural steps)

- **ผิวหนัง** ให้ใช้ใบมีดผ่าตัดขูดผิวหนัง (skin scraping) บริเวณขอบของรอยโรคให้ได้ขุย



ขั้นตอนของกระบวนการงาน (Procedural steps)

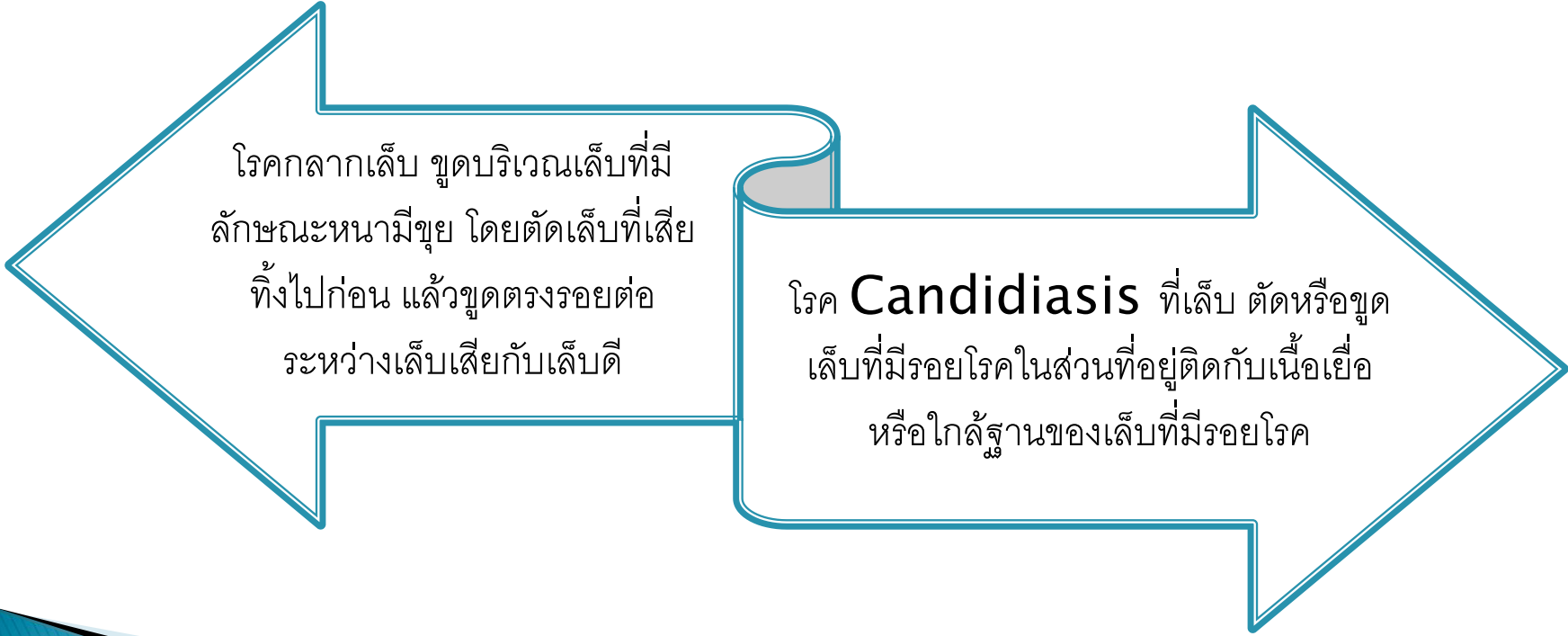
- **เส้นผมและขน** ให้ใช้ forceps คีบแล้วถอนให้ได้รากติดมาด้วย หรือใช้กรรไกรตัดเฉพาะส่วนที่เห็นรอยโรค



ขั้นตอนของกระบวนการงาน

(Procedural steps)

- **เล็บ** ที่มีรอยโรคสังเกตได้ง่ายจากการเปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างมีปลายโค้งงอ เพราะ หักง่าย หรือยุ่ย อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างส่งตรวจคือใบมีดผ่าตัด เพื่อขูดให้ได้ขุยบริเวณเล็บ



โรคกลากเล็บ ขูดบริเวณเล็บที่มี
ลักษณะหนา มีขุย โดยตัดเล็บที่เสีย
ทิ้งไปก่อน แล้วขูดตรงรอยต่อ
ระหว่างเล็บเสียกับเล็บดี

โรค **Candidiasis** ที่เล็บ ตัดหรือขูด
เล็บที่มีรอยโรคในส่วนที่อยู่ติดกับเนื้อเยื่อ
หรือใกล้ฐานของเล็บที่มีรอยโรค

ขั้นตอนของกระบวนการงาน (Procedural steps)

- **เยื่อบุ** ใช้ไม้พันสำลี (swab) ป้ายผ้าจากรอยโรคโดยตรง ยกเว้นในบางโรคที่ต้องการขูด (scraping) ด้วยมีดขึ้นอยู่กับลักษณะของรอยโรค

Oral thrush ให้ใช้ swab ป้ายผ้าขาวบริเวณเยื่อบุในช่องปาก

Vaginal thrush/Candida balanitis thrush
ให้ใช้ swab ป้ายผ้าขาวโดยตรงจากรอยโรคที่ช่องคลอดหรืออวัยวะเพศชาย

ขั้นตอนของกระบวนการงาน (Procedural steps)

➤ ขั้นตอนการตรวจ

- ตรวจสอบ ชื่อ-สกุล ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจกับใบส่งตรวจว่าตรงกันหรือไม่
- เขียน ชื่อ-สกุล ผู้ป่วยลงบนแผ่นสไลด์ผ้า
- นำสิ่งส่งตรวจวางบน slide หยด 10% KOH 1 หยด
- ปิดทับด้วย cover slip นำสไลด์ไปอังผ่านเปลวไฟให้พออุ่น
- นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ปรับ condenser และ/หรือ diaphragm ของกล้องให้แสงผ่านแต่น้อยหรือปานกลาง

ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ (Quality control procedures)

ควบคุมคุณภาพน้ำยา

- ทำแบบบันทึกการควบคุมคุณภาพ 10%KOH (F-LAB-092) โดยบันทึกทุกครั้งที่มีรายการทดสอบ

Internal Quality Control

- ทำ Photography ลงในแบบบันทึก IQC การดู Slide KOH (F-LAB-087)

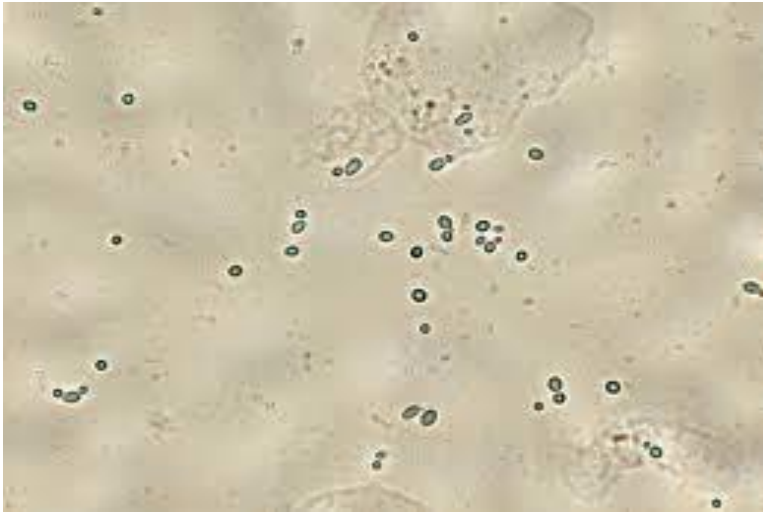
External Quality Control

- ทำ Interlaboratory comparison by Photography ปีละ 1 ครั้ง ร่วมกับโรงพยาบาลในเครือข่าย

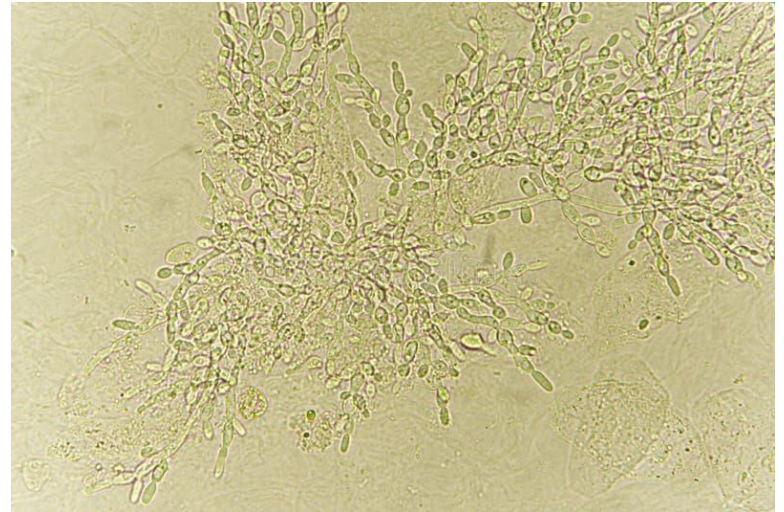
รายงานผลการทดสอบ

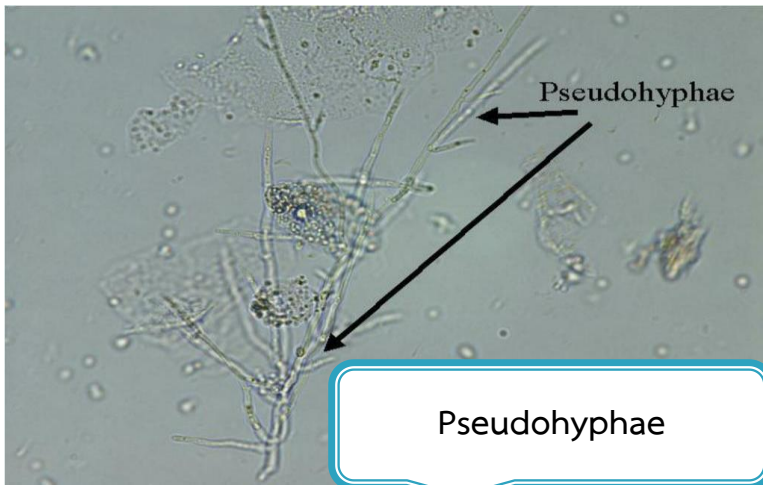
- พบเชื้อรา รายงานลักษณะของเชื้อรา เช่น Yeast cell , Budding yeast cells, Pseudohyphae, Septate hyphae, Arthroconidia และ Round thick-walled yeast cells เป็นต้น
- ไม่พบเชื้อรา รายงาน Not Found

Oval Yeast cell

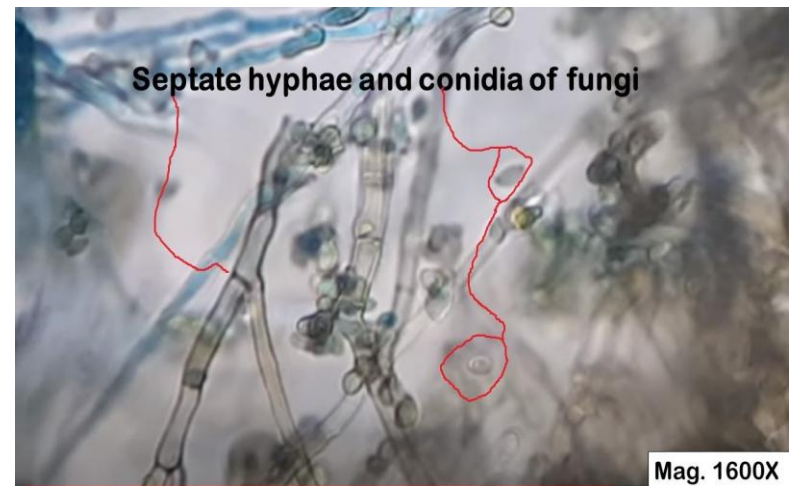


Oval Budding yeast cells





Septate hyphae



Thank
You

