

วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสารการย้อมสี..Gram..Stain.....

รหัสเอกสารWI-LAB-MB001.....

ผู้จัดทำ..... (.....นายภุชเวท.....แซ่ท้าว.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่จัดทำ.....5..มกราคม..2569.....
ผู้ทบทวน..... (.....น.ส.จิราพร.....ใจชื่น.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่ทบทวน.....5..มกราคม..2569.....
ผู้อนุมัติ..... (.....น.ส.จิราพร.....ใจชื่น.....) ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....	วันที่อนุมัติ.....6..มกราคม..2569.....
สำเนาฉบับที่.....01.....	ผู้ถือครอง.....เทคนิคการแพทย์.....
แก้ไขครั้งที่.....00.....	วันที่เริ่มใช้.....2..ตุลาคม..2558.....
แก้ไขครั้งที่.....01.....	วันที่เริ่มใช้.....2..มกราคม..2566.....
แก้ไขครั้งที่.....02.....	วันที่เริ่มใช้.....6..มกราคม..2569.....
แก้ไขครั้งที่.....	วันที่เริ่มใช้.....
แก้ไขครั้งที่.....	วันที่เริ่มใช้.....

	วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 2 ของ 8
	เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
ผู้จัดทำ : นายกฤษเวท แซ่ท้าว ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ วันที่ 5 มกราคม 2569			
ผู้รับรอง : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ วันที่ 5 มกราคม 2569			
ผู้อนุมัติ : นางสาวจิราพร ใจชื่น ตำแหน่ง หัวหน้างานเทคนิคการแพทย์ วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569			

รายการทบทวนและแก้ไข

แก้ไขครั้งที่	วันที่	รายละเอียดการแก้ไข
00	1 ตุลาคม 2558	- เริ่มจัดทำ
00	2 ตุลาคม 2558	- ประกาศใช้
01	1 มกราคม 2566	- ทบทวนเอกสาร
01	2 มกราคม 2566	- ประกาศใช้
02	5 มกราคม 2569	- ทบทวนเอกสาร
02	6 มกราคม 2569	- ประกาศใช้

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 3 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการย้อมสี Gram Stain ดูการติดสี และรูปร่างลักษณะการเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรีย ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

เพื่อช่วยในการวินิจฉัยการติดสี และรูปร่างลักษณะการเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อจำแนกแยกชนิดแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกในสิ่งส่งตรวจ

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 3.1 เอกสารใบแนบชุดน้ำยาสีย้อม Gram Stain
- 3.2 คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดต่อเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

Gram positive แบคทีเรียแกรมบวก (ติดสีม่วง) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของ peptidoglycan ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ และมีการเชื่อมต่อของ peptide bridge อย่างสมบูรณ์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก มีความสามารถในการรับสารพวก prosaniline dye เช่น Crystal Violet และหลังจากการตรึงสี Crystal Violet ด้วย Mordanting-agent ได้แก่ Gram iodine จะเกิดเป็นสารประกอบ complex ที่เรียกว่า Crystal Violet Iodine Complex ให้ติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียหลังจากการล้างสี (Decolorization) ด้วย decolorizer agent เช่น Alcohol หรือ Acetone Teichoicacid cross-links จะช่วยให้แบคทีเรียแกรมบวกมีความสามารถที่จะทนต่อ decolorizer อีกทั้งยังทำให้ pore size ใน peptidoglycan มีขนาดลดลงด้วย จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวกยังคงรักษา Crystal Violet Iodine Complex จึงย้อมแกรมแล้วติดสีม่วง

Gram negative แบคทีเรียแกรมลบ (ติดสีแดง) ชั้นของของ peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และมีการเชื่อมต่อของ peptide bridge ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้จะมีผนังชั้นนอกหุ้ม peptidoglycan ไว้อีกชั้นหนึ่งผนังชั้นนอกประกอบด้วย Lipopolysaccharide และ phospholipid อีกทั้งแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้น peptidoglycan บางกว่า และมี crosslink ที่หนาแน่น

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 4 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

น้อยกว่า ทำให้ pore size มีขนาดใหญ่กว่าหรือแม้แต่หลังจากการล้างสีด้วย decolorizer agent ก็ยังคงมี pore size ใหญ่กว่าในแบคทีเรียแกรมบวก Crystal Violet Iodine Complex จึงถูกขจัดออกจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ หลังจากขบวนการ Decolorization เมื่อมีการเติม counterstain ได้แก่ Safranin O ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจึงย้อมติดสีแดง

5.หลักการ (Principle)

เมื่อย้อมด้วย Crystal violet สีจะซึมเข้าไปใน cytoplasm ของแบคทีเรีย และเมื่อย้อมทับด้วย Gram iodine ก็จะเข้าไปจับกับ Crystal violet เกิดเป็น Crystal iodine complex ซึ่งมีโมเลกุลโตขึ้นจึงไม่สามารถหลุดออกจากตัวแบคทีเรียได้ เมื่อล้างด้วย alcohol หรือ acetone alcohol ซึ่งเป็นสารละลายไขมันจะไปละลายไขมันที่มีอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบ มีไขมันที่ผนังเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างในลักษณะเดียวกันรูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ย่อมโตกว่ารูที่เกิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก Crystal iodine complex จึงหลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่หลุดออกจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อล้างด้วย acetone alcohol อย่างถูกต้อง แต่ถ้าล้างมากเกินไปย้อมทำให้ complex ในแบคทีเรียแกรมบวกหลุดออกด้วย ในทำนองเดียวกัน ถ้าล้างน้อยเกินไป complex ในแบคทีเรียแกรมลบก็ไม่หลุดออกจึงทำให้ติดสีผิด เมื่อย้อมทับด้วย Safranin O จะไปติดที่แบคทีเรียที่ไม่มีสีอยู่ทำให้เป็นสีแดง คือ แกรมลบ ส่วนแบคทีเรียที่มีสีติดอยู่แล้วจะไม่ติดสี Safranin O จึงเห็นเป็นสีม่วงคือแกรมบวก

6.เอกสารที่เกี่ยวข้อง (Associated documents)

6.1 QP-LAB-001

6.2 QP-LAB-002

7.ความปลอดภัย (Safety)

7.1 ปฏิบัติงานโดยนักเทคนิคการแพทย์

7.2 สวมถุงมือ เสื้อกาวน์ (gown) แว่นตา และหน้ากากอนามัย ป้องกันการปนเปื้อนขณะปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 5 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

7.4 การสเมียร์สไลด์ควรทำในตู้ BSC Class II และย้อมสี Gram Stain ควรทำใน Fume hood เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ

7.5 ชุดน้ำยาสีย้อม Gram Stain ใช้สำหรับตรวจดูรูปร่าง ลักษณะการเรียงตัว และการติดสีทางจุลชีววิทยา เท่านั้น

7.6 ชุดน้ำยาสีย้อม Gram Stain จัดเป็นสารเคมีอันตรายต่อสุขภาพ เมื่อสัมผัสทางผิวหนัง เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ ถูกสัมผัสทางตา ก่อให้เกิดระคายเคืองในตาและตาแดง สุดตมมาก ก่อให้เกิดระคายเคืองต่อระบบหายใจ อาจทำให้เกิดอาการไอ เจ็บคอ และถ้ารับประทานจำนวนมาก ก่อให้เกิด คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย

7.7 ชุดน้ำยาสีย้อม Gram Stain บรรจุ Decolorizer จัดเป็นสารเคมีไวไฟ

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

8.1 ชุดน้ำยาสีย้อม Gram Stain บรรจุด้วย Crystal violet, Gram iodine, Decolorizer และ Safranin O

8.2 จุลทรรศน์

8.3 แผ่นสไลด์ผ้า

8.4 นาฬิกาจับเวลา

8.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์

9.สารมาตรฐาน (Standard)

-

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

10.1 เขียนชื่อ-นามสกุล ผู้ป่วยลงไปในแผ่นสไลด์

10.2 Smear slide ปล่อยให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วนำไป fixed โดยการผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง

10.3 ย้อมด้วย Crystal violet นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

10.4 ย้อมด้วย Gram iodine นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

10.5 ล้างด้วย Decolorizer แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า

10.6 ย้อมด้วย Safranin O นาน 1 นาที

10.7 เมื่อ slide แห้งแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 6 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

11.การคำนวณ (Calculation)

-

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ควบคุมคุณภาพ Gram Stain ทั้งแกรมลบและแกรมบวก เดือนละครั้ง ทำการย้อมสี Slide ที่เตรียมจากเชื้อ E.coli (Gram negative) และ S.aureuse (Gram positive) และบันทึกผลลงใน ตารางบันทึกผล IQC งานจุลชีววิทยา Gram Stain

การควบคุมคุณภาพภายนอก

- เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพทางห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอก กองทดสอบความชำนาญ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีละ 3 ครั้ง

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 7 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

14. การรายงานผล (Report of analysis)

ดูสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่าก่อน เพื่อดูให้ทั่วก่อนว่ามีแบคทีเรีย เซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์อื่นๆ หรือไม่ และดูด้วยหัว oil immersion lens การติดสี และรูปร่างลักษณะการเรียงตัวของเชื้อแบคทีเรียดังนี้

การติดสี	Gram positive แบคทีเรียติดสีน้ำเงิน
	Gram negative แบคทีเรียติดสีแดง
รูปร่าง และการเรียงตัว	cocci in irregular cluster, single, pair and short chain
	Cocci in chain
	diplococci
	coccobacilli
	bacilli
	bacilli with pleomorphic appearance
	bacilli with terminal spore
	bacilli with subterminal and central spore
	bacilli in Chinese letter or palisade
	bacilli with bipolar staining

การรายงานปริมาณเชื้อที่พบ	
Not found microorganism	ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย
Rare	พบแบคทีเรีย < 1 cells/OPF
Few	พบแบคทีเรีย 1-5 cells / OPF
Moderate	พบแบคทีเรีย 6-30 cells / OPF
Numerous	พบแบคทีเรีย > 30 cells / OPF

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 8 ของ 8
เรื่อง : การย้อมสี Gram Stain	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB001	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

หมายเหตุ

โดยให้รายงานจำนวน PMN และ Epithelium ที่พบด้วย โดยเฉพาะการรายงานผล Gram Stain จาก Sputum smear ต้องบอกคุณภาพของ Sputum ด้วยว่าเก็บมาอย่างถูกต้อง โดยรายงานเพิ่มเติมของจำนวนเซลล์จากร่างกายได้แก่ PMN, Mononuclear cell และ Epithelial cell โดยมีรูปแบบการรายงาน คือ ถ้าเป็น PMN และ Mononuclear cell ให้รายงาน (> 25 cells/LPF) ส่วน Epithelial cell ให้รายงาน (< 10 cells/LPF) ถ้าเก็บ sputum มาอย่างไม่ถูกต้องให้รายงานตรงข้ามกัน เช่น PMN < 25 cells/LPF , Epithelial cell > 10 cells/LPF

ในกรณีที่ส่งส่งตรวจเป็น Sputum ให้ระบุชนิดของสิ่งส่งตรวจด้วยว่าเป็น ชัน เหลือง เขียว, ปนเลือด, ปนน้ำลาย, น้ำลาย

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

สิ่งส่งตรวจ Sputum, Pus, Urine, Body fluid, Stool, CSF และ Discharge