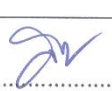


วิธีปฏิบัติ (Work instruction)

ชื่อเอกสารการย้อมสี..AFB..โดยวิธี..Ziehl-Neelsen..method.....

รหัสเอกสารWI-LAB-MB002.....

ผู้จัดทำ.......... (.....นายกฤษฎา.....แช่ท้าว.....) 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 7
	เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	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 7
เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

1.ความมุ่งหมาย (Purpose)

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติงานในการตรวจ AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method ให้ปฏิบัติงานให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน ได้อย่างถูกต้อง

2.การนำไปใช้ (Application)

- 2.1 ตรวจหาเชื้อ Acid Fast Bacilli เพื่อวินิจฉัยวัณโรค
- 2.2 ตรวจหาเชื้อ Acid Fast Bacilli เพื่อวินิจฉัยวัณโรคนอกปอด

3.เอกสารอ้างอิง (Reference)

- 3.1 เอกสารใบแนบชุดน้ำยาสีย้อม AFB บริษัทไบโอเทค
- 3.2 แนวทางการดำเนินงานด้านชันสูตรวัณโรคระดับชาติ กระทรวงสาธารณสุข 2541
- 3.3 คู่มือการปฏิบัติงานแบบที่เรียบง่าย สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป 2561(MNLAB-076)
- 3.4 การประกันคุณภาพการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำนักรวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
- 3.5 การรายงานปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ เมื่อย้อมสีตามวิธี Ziehl-Neelsen ตามเกณฑ์ของ WHO / The UNION

4.นิยามและคำย่อ (Terminology and abbreviation)

Acid fast staining เป็นวิธีการย้อมสีทนกรดที่ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในกลุ่ม Mycobacterium spp. ซึ่งผนังเซลล์มีส่วนประกอบของ mycolic acid อยู่มากกว่า ร้อยละ 60 ทำให้สามารถติดสีได้ดีแม้จะใช้ decolorizer ที่มีส่วนผสมเป็น acid alcohol

Acid Fast Bacilli คำย่อ AFB

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 4 ของ 7
เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

5.หลักการ (Principle)

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

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 ป้องกันการปนเปื้อนขณะ

ปฏิบัติงาน

7.3 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจอาจยังมีความสามารถในการก่อโรค ดังนั้น จึงควรจัดการทิ้งลงในถังขยะติดเชื้อ

7.4 การสเปรย์สไลด์ควรทำในตู้ BSC Class II และย้อมสี AFB ควรทำใน Fume hood เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ

7.5 ชุดน้ำยาย้อม AFB ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ acid fast bacilli ทางจุลชีววิทยา เท่านั้น

7.6 ชุดน้ำยาย้อม AFB จัดเป็นสารเคมีอันตรายต่อสุขภาพ เมื่อสัมผัสทางผิวหนัง เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ ถูกสัมผัสทางตา ก่อให้เกิดระคายเคืองในตาและตาแดงรุนแรงมาก ก่อให้เกิดระคายเคืองต่อระบบหายใจ อาจทำให้เกิดอาการไอ เจ็บคอ และถ้ารับประทานจำนวนมาก ก่อให้เกิด คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย

7.7 ชุดน้ำยาย้อม AFB บรรจุ Decolorizer จัดเป็นสารเคมีไวไฟ

8.เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and Supplies)

8.1 กล้องจุลทรรศน์

8.2 carbol fuchsin solution

8.3 3 % Acid alcohol

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 5 ของ 7
เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

8.4 Methylene Blue

8.5 Glass slide

8.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

8.7 ไม้จิ้มฟัน

8.8 ไม้เสียบลูกชิ้น

8.9 Fume hood

8.10 Biological safety cabinet class II

9.สารมาตรฐาน (Standard)

-

10.วิธีดำเนินการ (Procedure)

10.1 เขียน Lab No. และวันที่ ไว้ที่หัว Slide เฉพาะสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะนอกนั้นส่ง

ตรวจ อย่างอื่นให้เขียน ชื่อ-นามสกุล และ HN

10.2 การเลือกเสมหะ โดยเขียนที่ลักษณะเป็นก้อนเมือกเหนียว สีขุ่นเข้มคล้ายหนอง

10.3 ละเลงเกลี่ยเสมหะเป็นก้อนหอยเล็กๆ ติดต่อกันโดยเริ่มจากบริเวณตรงกลางสไลด์แล้ววนออกจน ได้ขนาดมาตรฐาน 2 x 3 cm ได้ smear ที่ไม่บางหรือหนาเกินไป เมื่อถือ smear เหนือตัวอักษร 5 cm ยังสามารถพ้ออ่านได้

10.4 ปลอ่ยทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึง Fix slide โดยผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง

10.5 ย้อม slide ด้วยสารละลาย carbol fuchsin ให้ท่วม slide ลนไฟอ่อนๆ ไปมาให้มีควันกรุ่นๆ ขึ้น 2-3 นาที (ระวังอย่าให้สีแห้ง) หยุดลนไฟทิ้งไว้ 5 นาที

10.6 ล้างออกด้วยน้ำสะอาด จนไหลผ่านไม่มีสี

10.7 ล้างด้วย 3 % Acid alcohol ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

10.8 ล้างออกด้วยน้ำสะอาด

10.9 ย้อมด้วย Methylene Blue ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

10.10 ล้างออกด้วยน้ำสะอาด

10.11 ปลอ่ย slide ให้แห้งแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

*** หมายเหตุ กรณีตัวอย่างเป็นหนอง (pus) และอุจจาระ (Stool) ให้เตรียม Smear AFB เหมือนเตรียมจากเสมหะ

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 6 ของ 7
เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

11.การคำนวณ (Calculation)

-

12.การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

การควบคุมคุณภาพภายใน

- ทำการย้อมสี Slide ที่เตรียมจากเสมหะของผู้ป่วยที่ให้ผล AFB Positive และ AFB Negative และบันทึกผลลงในตารางบันทึก IQC งานจุลชีววิทยา AFB Stain เดือนละ 1 ครั้ง

การควบคุมคุณภาพภายนอก

- เข้าร่วมทำ EQA กับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ปีละ 3 ครั้ง
- เข้าร่วมประเมินคุณภาพ Slide AFB กับ สคร.2 พิษณุโลก ปีละ 3 ครั้ง

13.การบันทึกข้อมูลและเอกสารที่ใช้ (Data record and documentation)

บันทึกผลลงใน TB.04 และลงในระบบ LIS ของห้องปฏิบัติการ โดยระบบจะเชื่อมต่อเข้าสู่ระบบ HIS อัตโนมัติ

14. การรายงานผล (Report of analysis)

รายงานผล	จำนวนเชื้อที่พบ	จำนวนวงกล้องที่ตรวจ (อย่างน้อย)
No AFB Observed	No AFB/ 100 field	200 field
Scanty (ระบุจำนวน)	1-9 AFB/ 100 field	100 field
Positive 1+	10-99 AFB/ 100 field	100 field
Positive 2+	1-10 AFB/ 1 field	50 field
Positive 3+	>10 AFB/ 1 field	20 field

กรณีที่ไม่มีพบเชื้อจากการตรวจดูทั่วแผ่น slide แล้ว ให้รายงานเป็น No AFB Observed ในการรายงานผล และให้รายงานจำนวน PMN และ Epithelium ด้วยทุกครั้ง เฉพาะการรายงานผล AFB stain จาก

วิธีปฏิบัติงาน: วิธีปฏิบัติ (Work Instruction)	ชื่อหน่วยงาน : กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลวังเจ้า	หน้า 7 ของ 7
เรื่อง : การย้อมสี AFB โดยวิธี Ziehl-Neelsen method	เอกสารเลขที่ : WI-LAB-MB002	แก้ไขครั้งที่ : 02
วันที่บังคับใช้ : 6 มกราคม 2569		

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

ในกรณีที่ส่ง Sputum ที่เป็นน้ำลาย ให้ระบุชนิดส่งส่งตรวจด้วยว่าเป็น Sputum (น้ำลาย)

15.รายละเอียดอื่น (Supplementary note)

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

*** ข้อควรระวัง บางครั้งตัวเชื้อจะย้อมไม่ติดสี จะเห็นเป็นช่องว่างวาวๆ ซึ่งก็คือเชื้อ AFB

เช่นกัน