



## แผนกพยาธิวิทยา

### โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา

#### วิธีปฏิบัติงาน

#### เรื่อง

### การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค

WI-LAB-089

แก้ไขครั้งที่ 0

ผู้จัดทำ



(นางสาวอัญชัชชา โยธาจันทร์)

ผู้จัดการวิชาการสาขาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก

11 พฤศจิกายน 2562

ผู้ทบทวน

ร.ต.หญิง 

(อรกัญญา ทรงทอง)

ผู้จัดการคุณภาพ

11 พฤศจิกายน 2562

ผู้อนุมัติ


พ.อ. 

(ฉัตรมงคล คนขยัน)

หัวหน้าห้องปฏิบัติการ

11 พฤศจิกายน 2562

วันที่ประกาศใช้: 11 พฤศจิกายน 2562

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 1 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

## 1. วัตถุประสงค์ของการทดสอบ ( Purpose of the examination )

- 1.1 เป็นการตรวจหาเชื้อทوبرคูลอส (AFB) ในผู้ที่มีอาการสงสัยวัณโรคปอดทางห้องปฏิบัติการงานพยาธิวิทยา
- 1.2 วินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรีย ประเมินสมภาวะการติดเชื้อหรือติดตามผลการรักษา

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

วิธี Kinyoun carbonfuchsin stain ( Cold acid – Fast stain )


หลักการ AFB หรือ Acid Fast bacilli เป็นแบคทีเรียที่เมื่อถูกย้อมด้วยสีชนิด Fuchsin แล้วจะทนต่อการถูกล้างด้วย acid alcohol ดังนั้นเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นลักษณะ bacilli ที่ติดสีแดงของ fuchsin เมื่อย้อมทับด้วยสี counter stain เช่น methylene blue เชื้อที่ไม่ใช่ AFB จะติดสีน้ำเงินของ methylene blue เชื้อ Mycobacterium เป็นเชื้อที่ผิวผนังเซลล์มีไขมันเป็นองค์ประกอบเป็นจำนวนมาก การย้อมด้วย Gram's stain ตามขั้นตอนปกติ ไม่สามารถทำให้แทรกซึมเข้าไปจับกับผนังเซลล์ได้ โดยทั่วไปนิยมใช้ Acid – Fast stain ซึ่งเป็นสีที่จะจับกับไขมันในผนังเซลล์ได้ดีกว่า และเมื่อจับแล้วแม้จะล้างด้วย acid alcohol สีก็ไม่หลุดออกมา แบคทีเรียชนิดอื่นก็สามารถจับสีย้อมไว้ได้เช่นกัน แต่สีที่จับไว้ได้นี้จะหลุดหมดเมื่อล้างด้วย acid alcohol ในการตรวจหาเชื้อ Mycobacterium การใช้ acid alcohol ในการตรวจเบื้องต้นจึงมีประโยชน์มาก โดยเลือกใช้วิธี Kinyoun carbonfuchsin stain

## 3. ข้อมูลจำเพาะด้านประสิทธิภาพ (Performance characteristics)

ไม่มี

## 4. ชนิดตัวอย่าง (Type of sample)


- 4.1 เสมหะ
- 4.2 Body fluid
- 4.3 Stool
- 4.4 Urine

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 2 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

## 5. การเตรียมผู้ป่วย( Patient preparation )

การเก็บสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย พากะ หรือผู้สัมผัสโรค ควรนำส่งห้องปฏิบัติการอย่างรวดเร็วเพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและการแปลผลของการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ ดังนั้นผู้ทำการเก็บและนำส่งสิ่งส่งตรวจ ต้องทราบวิธีการเก็บตัวอย่างว่าเก็บอย่างไรให้สิ่งส่งตรวจมีคุณภาพ เช่น ในการเก็บเสมหะไม่ควรมีน้ำลายปนมากเกินไป และต้องเก็บใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ

สิ่งส่งตรวจ	ภาชนะสำหรับเก็บ	วิธีเก็บ	การนำส่ง	การเก็บรักษา
เสมหะ	ใช้ขวดปราศจากเชื้อที่มีปากกว้าง มีฝาปิดได้แน่น หรือใช้ภาชนะที่แห้งสะอาดที่ยังไม่เคยใช้มาก่อน เช่น ถ้วยกระดาษเคลือบซีฟิ่งหรือถ้วยพลาสติก เป็นต้น ปิดฝาให้เรียบร้อย	การเก็บเสมหะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับปอดหรือหลอดลมควรเก็บในตอนเช้าหลังจากตื่นนอนใหม่ๆ ก่อนเก็บให้ทำความสะอาดช่องปากโดยการบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดธรรมดา เพื่อลดจำนวนเชื้อประจำถิ่นให้น้อยลง ให้ผู้ป่วยนอนในลักษณะที่ศีรษะและไหล่อยู่ต่ำกว่าทรวงอกเป็นเวลา 10 นาทีแล้วให้ขากหรือไอลึกๆ แรงๆจนได้เนื้อเสมหะมิใช่น้ำลายแล้วคายเสมหะนั้นลงในภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจ	นำส่งทันที ไม่ควรเกิน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง	ถ้าจำเป็นต้องเก็บไว้เกิน 2 ชั่วโมงให้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ควรเกิน 24 ชั่วโมง

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 3 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

## 6. ชนิดของภาชนะและสารเติมแต่ง (Type of container and additives )

ใช้ขวดปราศจากเชื้อที่มีปากกว้าง มีฝาปิดได้แน่น

## 7. เครื่องมืออุปกรณ์ที่จำเป็นและสารเคมี (Required equipment and reagents)

### 7.1 เครื่องมือ อุปกรณ์

7.1.1 กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย x100 เท่า

7.1.2 Oil Emersion

7.1.3 Slide ขนาด 22x75 mm.

7.1.4 ถาดย้อมสี

7.1.5 Slide ขอบฟ้า

7.1.6 ไม้จิ้มฟัน

7.1.7 กระดาษทิชชู

7.1.8 ไม้ขีด, ตะเกียงแอลกอฮอล์

### 7.2 ชุดน้ำยา AFB stain ประกอบด้วยน้ำยา 3 อย่าง ดังนี้

7.2.1 สี Carbol Fuchsin

7.2.2 3% Acid Alcohol

7.2.3 Methylene blue

## 8. การควบคุมสภาวะแวดล้อมและความปลอดภัย (Environmental and safety controls )


8.1 สิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่อาจมีการปนเปื้อนเชื้ออันตรายต่างๆ ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรสวมถุงมือทุกครั้งก่อน

ปฏิบัติการตามหลัก Universal Precaution ขณะเตรียมและ fix สเมียร์จะต้องปฏิบัติการใน ตู้ Biohazard

8.2 อุณหภูมิห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 20 – 40 องศาเซลเซียส

## 9. ขั้นตอนการสอบเทียบตรวจสอบย้อนกลับทางมาตรวิทยา(Calibration procedures (Metrological traceability )

ไม่มี

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณ์สีวะรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 4 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

## 10. ขั้นตอนของกระบวนการงาน ( Procedural Steps )

- 10.1 นำเสมหะของผู้ป่วยมา smear ให้เป็นวงรีกว้าง ๆ ประมาณ 2x4 ซม. และวางเป็นชั้นเดียวบน slide ใหม่ ๆ ที่สะอาดปราศจากไขมัน
- 10.2 ทิ้งให้แห้ง
- 10.3 Fixed slide ด้วยเปลวไฟ ที่ด้านล่างของสไลด์ 2-3 ครั้ง เพื่อให้สเมียร์เสมหะติดแน่นบนสไลด์
- 10.4 หยดสี Carbol Fuchsin ให้ท่วมบริเวณที่สเมียร์ของสไลด์ ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างสีออกโดยนำ slide ไปผ่านน้ำ ไม่ควรเทสีออกจากสไลด์ก่อนเพราะจะทำให้เกิดตะกอนสีขึ้นได้
- 10.5 หยดด้วย 3 % Acid alcohol โดยหยดทับให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา
- 10.6 ย้อมทับด้วยสี Methylene blue โดยให้สีท่วมสเมียร์นานประมาณ 1 นาที ล้างสีออก
- 10.7 เช็ดสไลด์ด้านหลังให้สะอาด ตั้งทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง
- 10.8 นำสไลด์ดังกล่าวไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x

## 11. ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพ( Quality Control Procedures )


วัสดุควบคุมคุณภาพ(control material) ได้แก่

- 11.1 Control slide ที่เตรียมขึ้นเองจาก sputum ที่มีและไม่มีเชื้อ AFB
- 11.2 หนังสือตำรารูปภาพ(atlas)แสดงการติดสีย้อม AFB/ Gram ของ bacteria และเซลล์ต่างๆ ซึ่งใช้เป็นวัสดุอ้างอิงติดปะหรือเก็บไว้อยู่ในบริเวณพื้นที่ปฏิบัติงาน และมีการดูสิ่งที่พบใน stain slide จากตัวอย่างผู้ป่วยเปรียบเทียบกับรูปภาพ
- 11.3 การประกันคุณภาพและการตรวจวิเคราะห์ วงรอบการทำ IQC ย้อมสี AFB smear เสมหะที่มีเชื้อ TB และไม่มีเชื้อ TB (เชื้ออื่นๆเช่น E.coliต้องย้อมติดสีน้ำเงิน)อ่านผล และบันทึกผลวิเคราะห์ IQC sample สัปดาห์ละ 1 ครั้งเฉพาะในวันที่มีการใช้สีย้อมตัวอย่างผู้ป่วย และเมื่อเปลี่ยนน้ำยาชุดใหม่หรือ LOT ใหม่

## 12. ขั้นตอนการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter laboratory comparisons)

วงรอบการทำ EQA/PT sample

- 12.1 เข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์สาขาจุลชีววิทยาคลินิก

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกษัตริย์สุวระ	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 5 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ความถี่ที่ต้องวิเคราะห์ EQA/PT sample พร้อมกับตัวอย่างตรวจของผู้ป่วยปีละ 3 ครั้ง

12.2 เมื่อผลประเมินไม่เป็นไปตามเกณฑ์หรือเป้าหมายที่กำหนด ให้บันทึกมาตรการแก้ไข/ป้องกัน ในแบบบันทึกปฏิบัติการแก้ไขกรณีผล EQA อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยอมรับคุณภาพ (FM-LAB-020)

### 13. สิ่งรบกวนการทดสอบ( Interferences )

การเก็บสิ่งส่งตรวจที่ไม่ได้คุณภาพ

14. หลักการของขั้นตอนคำนวณเพื่อให้ได้ผลลัพธ์รวมทั้งค่าความไม่แน่นอนของการวัดของการทดสอบเชิงปริมาณ ( 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 )

ค่าอ้างอิงของคนปกติ คือ ตรวจไม่พบเชื้อ AFB

16. ช่วงค่ารายงานผลการทดสอบ (Reportable interval of examination results )

การรายงานผลเพื่อหาเชื้อวัณโรค

Not found	ไม่พบ AFB/ 100 fields
รายงานจำนวนแน่นอนที่ตรวจพบ 1 - 9	AFB/ 100 fields
AFB 1+	10 - 99 AFB/ 100 fields
AFB 2+	1-10 AFB ใน 50 fields
AFB 3+	มากกว่า 10 AFB ใน 20 fields

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 6 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

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

ไม่มี

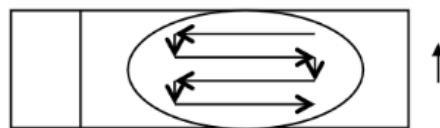
18. ค่าวิกฤติ/ค่าแจ้งเตือน/ที่เหมาะสม (Alert/critical values, where appropriate)

พบเชื้อ AFB

19. การแปลผลทางคลินิกของห้องปฏิบัติการ ( Laboratory clinical interpretation )

การรายงานผล


19.1 รายงานผลการตรวจโดย ดู slide ใช้กำลังขยาย 100x ซึ่งต้องดูให้ทั่วทั้ง Slide เริ่มต้นที่บริเวณขอบเสมียร์และตรงกลาง ดังรูป



19.2 วิธีการรายงานผล AFB slide

การรายงานผลเป็นไปตามวิธีของ American Lung Association โดยเริ่มดูจากขอบเสมียร์ด้านหนึ่ง แล้วเลื่อนตามลูกศรดังรูปข้างต้น จะได้พื้นที่ 300 Field เมื่อดูด้วยกำลังขยาย 100x แล้วรายงานดังนี้

Not found	ไม่พบ AFB/ 100 fields
รายงานจำนวนแน่นอนที่ตรวจพบ 1 - 9	AFB/ 100 fields
AFB 1+	10 - 99 AFB/ 100 fields
AFB 2+	1-10 AFB ใน 50 fields
AFB 3+	มากกว่า 10 AFB ใน 20 fields

	แผนกพยาธิวิทยา โรงพยาบาลค่ายกฤษณสีเวรา	
	วิธีปฏิบัติงานเรื่อง :การย้อมสีเพื่อวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค	
	รหัสเอกสาร :WI-LAB-089	หน้า 7 จาก 7 หน้า
	แก้ไขครั้งที่ : 0	วันที่ประกาศใช้ : 11พฤศจิกายน 2562

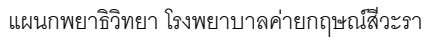
## 20. แหล่งที่มาของค่าความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้น (Potential sources of variation )

- 20.1 เสมหะที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้ได้สเมียร์ที่ไม่มีคุณภาพส่งผลให้โอกาสในการตรวจเจอเชื้อลดลง
- 20.2 การสเมียร์เสมหะบนสไลด์ควรสเมียร์ให้กระจายตัวลักษณะเป็นรูปก้นหอยจะทำให้มีโอกาพบเชื้อได้มากขึ้นและลดการที่เชื้อไปรวมกันเป็นกลุ่มในบริเวณสเมียร์หนาตัวเป็นก้อนทำให้อาจเกิดผล False Negative ได้

## 21. เอกสารอ้างอิง ( References )

- 20.1 พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์. การวินิจฉัยวัณโรค. ใน : การตรวจทางแบคทีเรียและราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 115-118.



[illegible]