วิธีปฏิบัติงาน
เรื่อง
การย้อมสี Gram's stain
โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

จัดเตรียมเอกสารโดย	ตรวจสอบเอกสารโดย	อนุมัติใช้เอกสารโดย
(ทนพญ.คุณากร ไตยมณี) นักเทคนิคการแพทย์	(ทนพญ.เบญจมาศ อรุณพาส) ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	(ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้) ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์

เลขที่เอกสาร	แก้ไขครั้งที่	สำเนาฉบับที่	วันที่เริ่มใช้
MSUH-WI-LAB-005	00		1 มีนาคม 2562

	โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม		
	วิธีปฏิบัติงาน เรื่อง :การย้อมสี Gram's stain	เอกสารเลขที่ MSUH-WI-LAB-005	หน้า 1 จาก 4
		แก้ไขครั้งที่ 00	วันที่เริ่มใช้ 1 มีนาคม 2561
	ผู้จัดทำ : ทนพญ.คุณากร ไตยมณี	หน่วยงาน : งานเทคนิคการแพทย์	
	ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ.เบญจมาศ อรุณพาส ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์	ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้ ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์	

การควบคุมระบบเอกสารคุณภาพ

แก้ไขครั้งที่	รายละเอียดการแก้ไข	ผู้ขอแก้ไข	ผู้อนุมัติการแก้ไข	วันที่เริ่มใช้เอกสารฉบับแก้ไข

บัญชีรายชื่อผู้ถือครอง

สำเนาฉบับที่	หน่วยงาน	ชื่อผู้ถือครอง	ตำแหน่ง

	โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม		
	วิธีปฏิบัติงาน **เรื่อง** :การย้อมสี Gram's stain	**เอกสารเลขที่** MSUH-WI-LAB-005	**หน้า 2 จาก 4**
		แก้ไขครั้งที่ 00	**วันที่เริ่มใช้** **1 มีนาคม 2561**
	ผู้จัดทำ : ทนพญ.คุณากร ไตยมณี	**หน่วยงาน** : งานเทคนิคการแพทย์	
	ผู้ตรวจสอบ : ทนพญ.เบญจมาศ อรุณพาส **ผู้จัดการวิชาการ งานเทคนิคการแพทย์**	**ผู้อนุมัติ : ทนพญ.เบญจพร แก้วคำใต้** **ผู้จัดการคุณภาพ งานเทคนิคการแพทย์**	

1. วัตถุประสงค์ (Purpose)

เพื่อให้การปฏิบัติงานในการย้อมสี Gram's stain มีแนวทางที่ถูกต้องชัดเจน เป็นคู่มือในการปฏิบัติงาน งานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสุทธาเวช คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อให้เจ้าหน้าที่ในหน่วยงานได้ปฏิบัติให้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน

2. การใช้งาน (Application)

เอกสารเรื่องการย้อมสี Gram's stain มีความครอบคลุมการดำเนินการตั้งแต่ได้รับสิ่งส่งตรวจถึงเจ้าหน้าที่ งานเทคนิคการแพทย์ รายงานผลการตรวจวิเคราะห์

3. หลักการ (Principle)

สี Crystal Violet จะซึมผ่านผนังของเซลล์แบคทีเรียเข้าไปในไซโตพลาซึม เมื่อย้อมด้วย Gram Iodine จะไปจับกับสีแรกเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่า Crystal Violet complex ซึ่งจะมีขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้น ในแบคทีเรียแกรมบวกมีไขมันที่ผนังเซลล์น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อล้างด้วยแอลกอฮอล์หรือ acetone alcohol ซึ่งเป็นสารละลายไขมัน จะยังคงรักษาสารประกอบเชิงซ้อนนั้นได้อยู่ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ จะเกิดรูที่ผนังเซลล์ ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียแกรมบวก จึงทำให้สารประกอบเชิงซ้อนหลุดจากเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ดี เมื่อย้อมทับด้วย Safranin จึงทำให้แบคทีเรียแกรมลบติดสีแดงของ Safranin ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกติดสีของ Crystal Violet อยู่แล้ว

4. การเก็บสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจจากส่วนต่างของผู้ป่วย

5. เครื่องมือเครื่องใช้ (Equipment and supplier)

1. สไลด์
2. ไม้จิ้มลูกชิ้นปลายทู่
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์

4. Forcep
5. สีย้อม: Crystal Violet, Gram Iodine, 95% Alcohol, Safranin

6. ขั้นตอนการตรวจ (Procedures)

1. เขียน ชื่อ-สกุล Serial No.ของผู้ป่วยบนแผ่นสไลด์ฝ้า ให้ถูกต้อง
2. สเมียร์สิ่งส่งตรวจบนแผ่นสไลด์
3. เมื่อแห้งแล้ว นำไปตรึงด้วยความร้อน โดยการผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง
4. ย้อมด้วย Crystal Violet นาน 1 นาที แล้วล้างน้ำ
5. ย้อมด้วย Gram Iodine นาน 1 นาที แล้วล้างน้ำ
6. ล้างด้วย 95 % Alcohol แล้วล้างน้ำ
7. ย้อมทับด้วย Safranin นาน 15-30 วินาที แล้วล้างน้ำ
8. เมื่อ Slide แห้ง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

7. การแปลผล

<u>การรายงานผล</u> ให้รายงาน

1. PMN
2. การติดสี Gram
3. รูปร่าง
4. จำนวน

: จำนวนแบคทีเรีย > 30 Cell/Oil Field : Numerous

: จำนวนแบคทีเรีย > 5-30 Cell/Oil Field : Moderate

: จำนวนแบคทีเรีย 1-5 Cell/Oil Field : Few

: จำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 1 Cell/Oil Field : Rare

: ไม่พบแบคทีเรีย Not found microorganism

8. การควบคุมคุณภาพ (Quality control)

- มีการควบคุมคุณภาพภายนอกโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกๆ 3 เดือน

-กำหนดให้มีการย้อมเชื้อมาตรฐาน Gram positive และ Gram negative เป็น IQC 1 ครั้ง/สัปดาห์

9. เอกสารอ้างอิง (References)

คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น