|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ผู้จัดทำ :………………………….  (นางสาวนันทิยา ใหญ่ยงค์)  นักเทคนิคการแพทย์ | ผู้ทบทวน :…………………….  (นางวันเพ็ญ อุทัยพร)  นักเทคนิคการแพทย์ ผู้จัดการวิชาการ | ผู้อนุมัติ :…………………….  (นางวชิราภรณ์ ทองเทศ)  ผู้จัดการคุณภาพหัวหน้างานชันสูตรสาธารณสุข |

**ประวัติการแก้ไข**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| วัน เดือน ปี  ที่ใช้ | แก้ไขครั้งที่ | หน้าที่แก้ไข | รายละเอียดการแก้ไข | ผู้แก้ไข | ผู้อนุมัติ |
| 3 เมษายน 2556 | 0 | - | เอกสารออกใหม่ | - |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**การตรวจ Wet smear และการย้อม Gram’s stain**

1. **วัตถุประสงค์**

# เพื่อเป็นคู่มือสำหรับตรวจหาเชื้อใน wet smear และใช้แยกชนิดและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียที่ออกมาจากจากสารคัดหลั่ง (secretion) ของผู้ชายหรือจาก Vaginal discharge ของผู้หญิงที่มีอาการตกขาว หรือเสมหะ ปัสสาวะ หนองจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ,เลือด, น้ำไขสันหลัง, ตา, ช่องหู ,ผิวหนัง

1. **หลักการ**

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย อาศัยการย้อมสีเชื้อที่ใช้ความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อทำให้ เชื้อติดสีไม่เหมือนกัน ซึ่งขั้นตอนการย้อมสีประกอบด้วยการย้อมสีแรก คือ Crystal Violet และ ตามด้วยสี Gram’s iodine เพื่อ ให้รวมตัวกันกลายเป็นผลึก (Crystal Violet-iodine Complex) ทำให้สีติดกับผนังเซลล์ได้ดีขึ้นต่อมาทำการล้างผลึกดังกล่าวด้วย decolorlizer ซึ่งประกอบด้วย acetone-alcohol ขั้นตอนนี้แบคทีเรียพวก gram negative ซึ่งมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยไขมันมากกว่าพวก gram positive จะถูกล้าง ผลึกดังกล่าวออกไป แต่แบคทีเรียพวก gram positive ซึ่งผนังเซลล์หนากว่าและมี teichoic acid เป็นองค์ประกอบทำให้จับ complex ดังกล่าวไว้ได้ดีกว่า จึงไม่ถูกล้างออกไป ขั้นตอนสุดท้ายคือการย้อมทับด้วยสี safranine เชื้อพวก gram positive มีผลึก ดังกล่าว จับกับผนังเซลล์อยู่แล้ว จึงไม่มีที่ว่างสำหรับ safranine อีก แต่พวก gram negative ซึ่งถูกล้าง crystal violet-iodine complex ออกไปแล้ว สามารถจับ safranine ไว้ได้ในขั้นตอนนี้

1. **วิธีการตรวจ**

ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. **เอกสารอ้างอิง**

ผล PAP และการดูแลรักษา โดย พญ.เปรมฤดี อริยานนท์ รพ.นครปฐม

1. **คำนิยามและคำย่อ**

NSS = Normal Saline

1. **เอกสารที่เกี่ยวข้อง**

6.1 Internal Quality Control for Gram’s stain

1. **ความปลอดภัย**

ปฏิบัติตามหลัก universal precaution

1. **เครื่องมือเครื่องใช้**
   1. 8.1 กล้องจุลทรรศน์
   2. 8.2 สไลด์
   3. 8.3 กระจกปิดสไลด์
   4. 8.4 Crystal Violet
   5. 8.5 Gram’s iodine
   6. 8.6 decolorlizer
   7. 8.7 safranine
   8. 8.8 NSS88778ค
2. **น้ำยาและสารมาตรฐาน**

* Crystal Violet
* Gram’s iodine
* Decolorlizer
* Safranine
* 8.8 NSS88778ค

1. **วิธีดำเนินการ**

การทำ wet smear

1. เก็บสิ่งส่งตรวจโดยป้ายหนองจากบริเวณใต้คอมดลูก (Posteria forix) ในผู้หญิง หรือจาก ท่อปัสสาวะ (Urethal discharge) ในผู้ชาย ใส่แผ่น slide หยด 0.9% NSS 1 หยด ปิดด้วย cover glass

2. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 x เพื่อตรวจหาเชื้อ Trichomonas vaginalis Fungus และ budding yeast

การทำ Gram’s stain

1. ป้ายหนองจากบริเวณ endocervical canal ในผู้หญิง บริเวณ Urethra ในผู้ชาย smear ให้เป็นวงกลมตรงกลาง slide ทิ้งให้แห้ง ผ่านความร้อน 2-3 รอบ นำไปย้อมสี

2. หยดสี Crystal violet ให้ท่วมบริเวณที่ smear เชื้อของ slide ดังกล่าว ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 นาที

3. ล้าง slide ดังกล่าวด้วยน้ำประปา

4. หยดสี gram’s iodine ลงบน slide ดังกล่าว ตั้งทิ้งไว้อีกเป็นเวลา 1 นาที

5. ล้าง slide ดังกล่าวด้วยน้ำประปา

6. หยดน้ำยา Decoloriner ลงบนslide ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที

7. เอียง slide ดังกล่าวไปมา 3-4 ครั้ง เพื่อให้สีที่ย้อมหลุดออกหมด

8. ล้าง slide ดังกล่าวด้วยน้ำประปา

9. หยดสี safranine ทิ้งไว้ 30 วินาที

10. ล้างออกด้วยน้ำประปา

11. นำ slide ผึ่งให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 x

12. รายงานผลการตรวจ ลงในใบส่งตรวจ

1. **การนับและการคำนวณ**

**-**

1. **การควบคุมคุณภาพ**

ทำ Internal control น้ำยา Gram stain และ NSS ทุกวันจันทร์หรือวันแรกของสัปดาห์

1. **การรายงานผลและการแปลผล**

การรายงานผล wet smear

ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 x

ถ้าพบเชื้อ Trichomonas Vaginalis ,fungus และ budding yeast

ให้รายงาน Trichomonas vaginalis seen , Pseudohyphae seen

ถ้าไม่พบเชื้อ Trichomonas Vaginalis ,fungus และ budding yeast

ให้รายงาน No Trichomonas vaginalis seen , No fungus seen

การรายงานผล Gram’s stain

ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 x

-รายงาน WBC เป็น 1+ หรือ2+ หรือ 3+หรือ 4+

4+ = > 30 / oil

3+ = 5-30 /oil

2+ = 1-5 /oil

1+ = < 1/ oil

* รายงาน bacteria เป็น (GPC,GNC,GPB,GNB)

WBC คือ White blood cell

GPC คือ Gram Positive Cocci

GNC คือ Gram Negative Cocci

GPB คือ Gram Positive Bacilli

GNB คือ Gram Negative Bacilli

1. **ค่าปกติ**

Not found

1. **ข้อระวัง,ข้อจำกัด**

ปัจจัยส่งเสริมต่อการติดเชื้อราในช่องคลอด

* การตั้งครรภ์ พบสูงกว่าหญิงไม่ตั้งครรภ์ ประมาณ 2 เท่า (เอสโตรเจนที่สูงขึ้นในระหว่างตั้งครรภ์จะทำให้ปริมาณ glycogen ในเยื่อบุช่องคลอดมากขึ้น)
* โรคเบาหวานที่ควบคุมน้ำตาลไม่ดี
* ยาปฏิชีวนะไปทำลายเชื้อที่อยู่ในลักษณะสมดุลกับเชื้อราในช่องคลอด
* ยาคุมกำเนิด พบเชื้อราในช่องคลอดในผู้ป่วยที่กินยาคุมกำเนิด ประมาณ ร้อยละ 20-45 (เอสโตรเจนเพิ่มปริมาณ glycogen)

ปัจจัยส่งเสริมต่อการติดเชื้อราในช่องคลอด

* ยา steroid ทำให้มีการติดเชื้อแบบแพร่กระจายได้ง่าย
* ความบกพร่องของภูมิต้านทาน
* ใส่เสื้อผ้าที่คับเกินไป
* เพศสัมพันธุ์