	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ : นายสำเร็จ พรหมมงคล	ผู้ทบทวน : นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ : ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รong เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน : สำนักงานบริหารการศึกษา

1. วัตถุประสงค์

สำหรับใช้เป็นคู่มือการตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี Direct wet smear

2. ขอบเขต

วิธีปฏิบัติงานฉบับนี้ครอบคลุมถึง ผู้ปฏิบัติงานในตรวจการวินิจฉัยเชื้อปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี Direct wet smear

3. ประเภทและชนิดของสิ่งส่งตรวจ (สำหรับการตรวจวิเคราะห์)

Stool

4. อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี (สำหรับการตรวจวิเคราะห์)



- 4.1 สไลด์ (Microscopic glass slide)
- 4.2 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip ขนาด 22 x 22 mm.)
- 4.3 ไม้วกวนอุจจาระ
- 4.4 น้ำเกลือ (0.85-0.9% Normal saline) หรือน้ำยาไอโอดีน (1% Lugol's iodine solution)
- 4.5 ปากกา
- 4.6 กระบอคน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเก็บ slides ที่ใช้แล้ว (ก่อนส่งทำลาย)
- 4.7 ขวดน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเก็บไม้วกวนอุจจาระที่ใช้แล้ว (ก่อนส่งทำลาย)

5. ความรับผิดชอบ

นายสำเร็จ พรหมมงคล

6. รายละเอียด

- 6.1 ขั้นตอนการรับส่งตรวจ

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ :นายสำเร็จ พรหม มงคล	ผู้ทบทวน :นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ :ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน :สำนักงาน บริหารการศึกษา

6.1.1 ตรวจสอบความถูกต้องและตรงกันของสิ่งส่งตรวจและข้อมูลในใบ request

6.2 วิธีดำเนินการ

6.2.1 การเตรียมตัวอย่างอุจจาระ

6.2.1.1 ใช้ปากกาเขียนหมายเลขตัวอย่างอุจจาระลงบนริมขอบด้านซ้ายของสไลด์

6.2.1.2 หยดน้ำเกลือ 1-2 หยด ลงบนด้านซ้ายของสไลด์ (ถ้าคาดว่าจะมี ไทรโฟซอर्थของอะมีบาให้ใช้น้ำเกลืออุ่น) และน้ำยาไอโอดีน 1-2 หยด ลงบนด้านขวาของสไลด์



6.2.1.3 ใช้ไม้กวนอุจจาระเขี่ยอุจจาระจากหลายๆจุด ขนาดเท่ากับหัวไม้ขีดไฟประมาณ 1 มิลลิกรัม มากวนกับน้ำเกลือบนสไลด์ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

6.2.1.4 ในทำนองเดียวกัน ใช้ไม้กวนอุจจาระเขี่ยอุจจาระจากหลายๆจุด ขนาดเท่ากับหัวไม้ขีดไฟมากวนกับน้ำยาไอโอดีน

6.2.1.5 วางกระจกปิดสไลด์ (Cover slip) ตะให้ทำมุมกับขอบของน้ำเกลือที่ผสมกับอุจจาระแล้วค่อยๆ วางลงโดยไม่ให้มีฟองอากาศ (ถ้ามีฟองอากาศจะทำให้ยากในการตรวจหาเชื้อปรสิต โดยเฉพาะ cyst ของโปรโตซัว และถ้าไม่มีความชำนาญ การดูและแยกชนิดทำได้ยากมาก)

6.2.2 การตรวจตัวอย่างอุจจาระ

6.2.2.1 นำสไลด์ที่เตรียมโดยวิธี direct wet smear มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวางสไลด์ลงบนแท่นวางวัตถุ ปรับปริมาณแสงให้พอเหมาะเพื่อให้สามารถมองเห็นเชื้อปรสิตได้ชัดเจน ตรวจ ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 10x ก่อน (ใช้ในการหา) (การใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจหาเชื้อปรสิต ต้องปรับ aperture diaphragm เหมาะกับ lens ที่ใช้) โดยเริ่มปรับภาพไปที่มุมบนด้านซ้ายแล้วจึงเลื่อนไปด้านหน้า เลื่อนลง ถอยหลัง เลื่อนลง แล้วเดินหน้า ทำเช่นนี้ไปจนสุดมุมล่างด้าน

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ : นายสำเร็จ พรหมมงคล	ผู้ทบทวน : นางสาวสมพรงามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ : ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน : สำนักงานบริหารการศึกษา

ขวามือ (เพื่อเป็นการตรวจให้ครบทั้งหมดใน Cover slip จะเริ่มมูมไหนักก็ได้และเลื่อนไปข้างหน้าให้ตลอดจนจบสุดอีกมูมหนึ่ง)

6.2.2.2 เมื่อพบสิ่งที่คาดว่าจะเป็นเชื้อปรสิตแล้ว จึงปรับเลนส์ใกล้วัตถุไปที่กำลังขยาย 40x และปรับ aperture diaphragm ขยายให้มากขึ้นเพื่อดูลักษณะรายละเอียดอีกครั้งเพื่อการวินิจฉัย แล้วจึงรายงานผล

6.2.2.3. สไลด์ที่ดูแล้วให้นำไปแช่น้ำยาฆ่าเชื้อค้างคืนเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อ



หมายเหตุ การปรับ aperture diaphragm คือการปรับระยะโฟกัส (ดูคล้ายๆ กับเป็นการปรับความเข้มของแสงแต่ไม่ใช่ การปรับความเข้มของแสง คือ การปรับที่ปุ่มเพิ่มลดแสง)

การตรวจหาไข่พยาธิและตัวอ่อนของพยาธิในน้ำเกลือ ไข่พยาธิสามารถวินิจฉัยได้ง่ายในน้ำเกลือ ไม่ควรย้อมด้วยน้ำยาไอโอดีน ไข่พยาธิ ส่วนมากมีขนาดใหญ่ มองเห็นชัดด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10x มีส่วนน้อยที่มีขนาดเล็กที่ต้องใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40x จึงจะมองเห็น นอกจากนี้ในน้ำเกลียยังอาจพบตัวอ่อนของพยาธิเส้นด้าย (*Strongyloides stercoralis*) ได้ ส่วนตัวอ่อนของพยาธิปากขอจะตรวจไม่พบใน ตัวอย่างอุจจาระที่เก็บใหม่ๆ แต่อาจตรวจพบได้ในตัวอย่างอุจจาระเก่า ซึ่งต้องวินิจฉัยแยกออกจาก ตัวอ่อนของพยาธิเส้นด้ายโดยดูที่ ส่วนปากและ genital primodium

ลักษณะของเชื้อโปรโตซัวในน้ำยาไอโอดีน ตัวอย่างอุจจาระที่ย้อมด้วยน้ำยาไอโอดีนเป็นการตรวจหาซิสต์ของอะมีบาและแฟลกเจลเลต ซึ่งตรวจหาด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10x แต่ไม่หักเหแสงเหมือนในน้ำเกลือ และตรวจแยกด้วยด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 40x เป็นการตรวจดูส่วนประกอบภายในและทำการวัดขนาดของซิสต์ เพื่อ ประกอบการวินิจฉัย ซึ่งการติดสีของซิสต์ที่ย้อมด้วยน้ำยาไอโอดีน จะเห็น nucleus ชัดขึ้น

ไซโทพลาสซึม	ติดสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อน
Glycogen vacuole	ติดสีน้ำตาลแกมแดง น้ำตาลเข้ม
Chromatoid bodies'	ไม่ติดสี

ในกรณีที่เป็นซิสต์ของ Entamoeba species อาจมองเห็นการเรียงตัวของ peripheral Chromatin และ karyosome ส่วนในแฟลกเจลเลตจะมองเห็น filaments

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ : นายสำเร็จ พรหมมงคล	ผู้ทบทวน : นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ : ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน : สำนักงานบริหารการศึกษา

6.3 การบันทึกข้อมูล

ถ่ายเอกสารใบ request เก็บในแฟ้มรายงานผลประจำห้องปฏิบัติการ

6.4 การคำนวณ

ไม่มี

6.5 ค่าอ้างอิง/ขอบเขตของค่าผู้ป่วยที่รายงาน

ไม่มี

6.6 การรายงานผล/การแปลผล

รายงานผลการตรวจเป็นบวก (Positive) egg, larva, adult, trophozoite, cyst, และ oocyst

รายงานผลการตรวจเป็นลบ (Not Found)

6.7 การควบคุมคุณภาพ

6.7.1 การตรวจโดยวิธีเข้มข้น (Concentration Method)

เป็นการทำให้เชื้อปรสิตในอุจจาระมารวมตัวกัน ในขณะที่เดียวกันก็มีการกำจัดเศษอุจจาระอื่นๆ ออกไป ช่วยให้สามารถตรวจพบเชื้อปรสิตที่มีจำนวนน้อยหรือไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี Direct wet Smear ซึ่งการตรวจโดยวิธีเข้มข้นประกอบด้วย 2 หลักการ คือ การตกตะกอน (sedimentation) และการลอยตัว (floatation)

6.7.2 อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมี (สำหรับการตรวจวิเคราะห์)

6.7.2.1. เครื่องปั่น (Centrifuge)

6.7.2 .2 หลอดปั่นขนาด15 ml (Centrifuge tube)

6.7.2.3 Beaker



6.7.2.4 กรวยพลาสติก (Plastic funnel)

6.7.2.5 ผ้าก๊อซ (gauze)

6.7.2.6 10% Formalin

6.7.2.7 น้ำเกลือหรือน้ำประปา (Normal saline or Tap water)

6.7.2.8 อีเทอร์ (Ether) หรือ Ethyl acetate

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ :นายสำเร็จ พรหม มงคล	ผู้ทบทวน :นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ :ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน :สำนักงาน บริหารการศึกษา

6.7.2.9 สไลด์ (Microscopic glass slide)

6.7.2.10 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip ขนาด 22 x 22 mm.)

6.7.2.11 ไม้ตักอุจจาระ (applicator)

6.7.2.12 ไม้ปลายพันสำลี (applicator with cotton)

6.7.2.13 พลาสเจอร์ปิเปต (pasture pipette)

6.7.2.14 ครอบก้นยาฆ่าเชื้อสำหรับเก็บ slides ที่ใช้แล้ว (ก่อนส่งทำลาย)

6.7.2.15 ขวดน้ำผสมน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับเก็บไม้ที่กวนอุจจาระที่ใช้แล้ว (ก่อนส่งทำลาย)

6.7.3 วิธีดำเนินการ

6.7.3.1 ตักอุจจาระประมาณ 5-10 g ใส่ลงใน beaker

6.7.3.2 เติมน้ำเกลือหรือน้ำประปาลงไปประมาณ 10 ml แล้วคนให้เข้ากัน

6.7.3.3 กรองด้วยผ้าก๊อช 2 ชั้น ใส่ลงในหลอดปั่น (ผ้าก๊อชควรทำให้ชุ่มน้ำก่อนใช้)

6.7.3.4 นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500-2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที



6.7.3.5 เทน้ำส่วนบนทิ้ง เติมน้ำลงไปใหม่ คนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหมือนในข้อ 4

6.7.3.6 ทำซ้ำตามข้อ 4 และ 5 หลายๆ ครั้งจนน้ำส่วนบนใส แล้วเทน้ำส่วนบนทิ้ง

6.7.3.7 เติม 10% Formalin ลงไป 10 ml คนให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ 5-10 นาที (ข้อนี้มีหลายคนทำผิด คือ พอเติม formalin แล้วไม่ตั้งทิ้งไว้ก่อนรีบเติม ether ทำให้เชื้อปรสิตถูก ether ทำลายไปด้วย)

6.7.3.8 เติม ether หรือ ethyl acetate 2-3 ml ปิดฝาหลอดปั่นให้แน่น เขย่าแรงๆ นาน 15-30 วินาที (เขย่าแรงๆ เพื่อให้ ether หรือ ethyl acetate สามารถทำปฏิกิริยาแยกเอาไขมันออก)

6.7.3.9 นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500-2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนผสมทั้งหมดแยกเป็น 4 ชั้น ดังรูปที่ 3-6

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ : นายสำเร็จ พรหมมงคล	ผู้ทบทวน : นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ : ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน : สำนักงานบริหารการศึกษา

6.7.3.10 เอียงหลอดและใช้ไม้เคาะให้ชั้นกากอุจจาระหลุดออกจากผิวหลอด เพียงโดยให้หลอดเอียงอยู่ ใช้ไม้ด้านปลายพันสำลีเช็ดกากอุจจาระให้หมดแล้วจึงค่อยเอียงหลอดกลับ

6.7.3.11 หยดน้ำเกลือลงไป 1-2 หยด ผสมตะกอนให้เข้ากัน

6.7.3.12 ใช้พลาสติกเจอร์ปิเปตกดแรงดันเบาๆ ที่ก้นหลอด เพื่อให้เชื้อปรสิตที่ติดอยู่ในตะกอนก้นหลอดหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย 10% formalin ดูดตะกอนไปหยดลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ก่อนนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่นเดียวกับวิธี Direct wet smear

6.7.3.1

6.7.4 การรายงานผล/การแปลผล

รายงานผลการตรวจเป็นบวก (Positive) egg, larva, adult, trophozoite, cyst, และ oocyst

รายงานผลการตรวจเป็นลบ (Not Found)

Formalin-ether sedimentation เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในงานตรวจประจำวันเพื่อยืนยันผลการตรวจ เพราะสามารถตรวจพบเชื้อปรสิตได้ทุกระยะ ยกเว้น ระยะโทรโฟซอइटของเชื้อปรสิตที่มีขนาดเล็ก ซึ่งอาจจะเสียรูปร่างบ้างและไม่สามารถดูการเคลื่อนที่ หลักการของวิธีนี้ คือ ทำให้ไข่หรือระยะต่างๆ ของเชื้อปรสิตมารวมตัวกันโดยการตกตะกอน เร่งการตกตะกอนโดยการปั่นและแยกสารที่เป็นส่วนประกอบของอุจจาระออกให้มากที่สุด ซึ่งอีเทอร์ หรือ Ethyl acetate ที่ใช้จะเป็นตัวละลายสกัดแยกเอาส่วนที่เป็นไขมันออกมา ส่วนฟอร์มาลินจะใช้ในการรักษารูปร่างของเชื้อปรสิต



7.ความปลอดภัยและการจำกัดอุปกรณ์ที่ใช้แล้ว

7.1 สวมถุงมือ หน้ากาก (Mask) และเสื้อกาวน์ ทุกครั้งขณะทำการตรวจวินิจฉัย

7.2 สวมรองเท้าที่เหมาะสมขณะทำปฏิบัติงานโดยสามารถปกป้องเท้าได้ทั้งหมด

7.3 ไม่อนุญาตให้นำอาหารและเครื่องดื่มทุกชนิดเข้ามารับประทานภายในห้องปฏิบัติการ

7.4 ไม่อนุญาตให้ผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องอยู่ภายในห้องปฏิบัติการ

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ :นายสำเร็จ พรหม มงคล	ผู้ทบทวน :นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ :ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน :สำนักงาน บริหารการศึกษา

7.5 ในขณะที่ทำงานภายในห้องปฏิบัติการ ไม่ควรปิดล็อกประตูทางเข้าทั้งหมด

7.6 ทำความสะอาดพื้นที่ที่ทำการตรวจวินิจฉัยและอุปกรณ์ที่จะใช้งานทั้งก่อนและหลังทำการตรวจวินิจฉัยทุกครั้ง

7.7 ตองล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่และเช็ดมือด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์) ก่อนและหลังทำการตรวจวินิจฉัยทุกครั้ง

7.8 เมื่อเกิดอุบัติเหตุขึ้นให้รายงานอาจารย์หรือเจ้าหน้าที่ผู้ดูแลห้องปฏิบัติการทุกครั้ง เพื่อเป็นข้อมูลในการป้องกันการอุบัติเหตุที่อาจจะเกิดขึ้นอีก



7.9 อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วที่แตกเสียหายควรแยกทิ้งในถังขยะที่จัดไว้โดยเฉพาะ

7.10 สำหรับอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยแล้วต้องทิ้งในภาชนะที่มีถุงพลาสติกครอบรับและมัดปากถุงทุกครั้งแล้วนำไปทิ้งในถังขยะสีแดง

7.11 ก่อนออกจากห้องปฏิบัติการทุกครั้งต้องตรวจดูความเรียบร้อยภายในห้องปฏิบัติการ เช่น ปิดน้ำ - ไฟ เครื่องปรับอากาศ พัดลมระบายอากาศและ ถอดปลั๊กเครื่องไฟฟ้าให้เรียบร้อยทุกครั้ง

ประวัติการจัดทำเอกสาร

รหัสเอกสาร	วัน/เดือน/ปี ที่อนุมัติ	รายการที่แก้ไข/เพิ่มเติม
BSTM_LABSOP002 ก.ค. 2564	เป็นการจัดทำครั้งที่ 1

 	ระเบียบปฏิบัติ : การตรวจวินิจฉัยเชื้อปรสิตทางการแพทย์		รหัสเอกสาร :BSTS_LABSOP002
	ผู้เสนอ :นายสำเร็จ พรหม มงคล	ผู้ทบทวน :นางสาวสมพร งามสมศิริสมสกุล	ลำดับการแก้ไข
	ผู้อนุมัติ :ผ.ศ ดร. พญ.วิรงค์ รอง เจียรกุล	วันที่ : กรกฎาคม 2564	หน่วยงาน :สำนักงาน บริหารการศึกษา