ต้นฉบับ

ฉบับสมบูรณ์
(ตามมติ ครั้งที่ 2 / 2566 เมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน 2566)
เพื่อประธาน/กรรมการฯ
ลีรา กิตติกุล
ศาสตราจารย์ ดร.ลีรา กิตติกุล

คู่มือการปฏิบัติงาน
เรื่อง การวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

โดยวิธีปกติ

ของ
นางสาวธิดาวรรณ เจริญสุข
ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ระดับปฏิบัติการ
(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12290)
ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง

นักเทคนิคการแพทย์ ระดับชำนาญการ
(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12290)
ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

คู่มือการปฏิบัติงาน
เรื่อง การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

โดยวิธีปกติ

ของ
นางสาวธิดาวรรณ เจริญสุข
ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ระดับปฏิบัติการ
(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12290)
ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง

นักเทคนิคการแพทย์ ระดับชำนาญการ
(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12290)
ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล
มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

คำนำ

คู่มือปฏิบัติงานเรื่อง การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานสำหรับนักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ประจำหน่วยงานและบุคลากรจากภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก ผู้จัดทำได้ศึกษา รวบรวมข้อมูลองค์ความรู้จากคู่มือ บทความต่าง ๆ และจากประสบการณ์การทำงานนำมาเขียนและเรียบเรียงเป็นคู่มือที่สามารถอ่านและเข้าใจได้ง่าย ประกอบด้วยคุณสมบัติและหลักการของเครื่องมือ วัตถุประสงค์การใช้งาน วิธีการใช้งาน การบำรุงรักษาและข้อควรระวังต่าง ๆ

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือปฏิบัติงานฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ปฏิบัติงานทุกท่านและทำให้การดำเนินงานของงานจุลชีววิทยาเต็มไปด้วยประสิทธิภาพและสัมฤทธิ์ผลตรงตามเป้าหมาย

ผู้จัดทำ
นางสาวธิดาวรรณ เจริญสุข
นักเทคนิคการแพทย์

สารบัญ หน้า

คำนำ ก
สารบัญ ข
สารบัญแผนภูมิ ค
สารบัญภาพ ง
สารบัญตาราง จ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
1.4 ขอบเขตของคู่มือปฏิบัติงาน 2
1.5 คำจำกัดความเบื้องต้น 3
บทที่ 2 โครงสร้างและหน้าที่ความรับผิดชอบ 4
2.1 โครงสร้างคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล 4
2.2 โครงสร้างการบริหารจัดการฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด 6
2.3 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของงานจุลชีววิทยา 7
2.4 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งและลักษณะงานที่ปฏิบัติ 8
บทที่ 3 การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper **11**
3.1 หลักการและคุณสมบัติของเครื่อง MALDI Biotyper 12
3.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper 14
3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง 14
3.2.2 ขั้นตอนการใส่ตัวอย่างเข้าในเครื่องเข้าในเครื่อง MALDI Biotyper 16
3.2.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม MALDI Biotyper RTC 19
3.2.4 การแปลผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง 24
3.2.5 การสอบเทียบ (Calibration) 26
3.2.6 การควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper 34
3.3 การบำรุงรักษาเครื่อง MALDI Biotyper 35
3.4 ข้อควรระวังในการใช้งาน 36
บทที่ 4 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางการแก้ไข **37**
ปัญหาอุปสรรค ในการปฏิบัติงาน
แนวทางการแก้ไขและพัฒนา
บทที่ 5 ข้อเสนอแนะ **41**
เอกสารอ้างอิง **43**
ภาคผนวก **44**

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 2.1 โครงสร้างคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล 5

แผนภูมิที่ 2.2 โครงสร้างการบริหารฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล 6

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper 12
ภาพที่ 2 ส่วนประกอบในการทำงานของเครื่อง MALDI Biotyper โดยอาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS 13
ภาพที่ 3 การเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 14
ภาพที่ 4 การสเมียร์โคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 14
ภาพที่ 5 สารละลาย HCCA 15
ภาพที่ 6 การหยดสารละลาย HCCA 15
ภาพที่ 7 กรดฟอร์มิก (70% Formic acid) 15
ภาพที่ 8 ตำแหน่งและปุ่มต่าง ๆ ของเครื่อง MALDI Biotyper 16
ภาพที่ 9 โปรแกรม FlexControl เมื่อเปิดใช้งาน 17
ภาพที่ 10 จอภาพแสดงสถานะพร้อมทำงาน 18
ภาพที่ 11 จอภาพแสดงสถานะของเครื่องไม่พร้อมทำงาน 18
ภาพที่ 12 การสร้างแผ่นงานที่ต้องการทดสอบ (Project) 19
ภาพที่ 13 การใส่ชื่องานที่ต้องการทดสอบ (Project name) 20
ภาพที่ 14 การใส่ชื่อผู้ทำการทดสอบ (Creator) 20
ภาพที่ 15 การเลือกตำแหน่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 21
ภาพที่ 16 ผลการเลือกตัวอย่างและใส่ชื่อตัวอย่าง 21
ภาพที่ 17 MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 22
ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างตำแหน่ง A1-A7 22
ภาพที่ 19 คำสั่งแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง 23
ภาพที่ 20 ใบรายงานผลวิเคราะห์ 23
ภาพที่ 21 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper 24
ภาพที่ 22 สารละลาย BTS (Bruker Bacterial Test Standard) 26
ภาพที่ 23 ตำแหน่ง A12 บนแผ่นรับ MALDI Target Plate สำหรับทดสอบ BTS 26
ภาพที่ 24 การเปิดไฟล์ “MBT_FC.par” เพื่อใช้งาน 27
ภาพที่ 25 ลักษณะของสารตัวอย่างที่เป็นผลึกดีและไม่ดี (หนาเกินไป) 27
ภาพที่ 26 Real time spectrum และ Sum spectrum 28
ภาพที่ 27 Reference mass ที่ใช้ในการทำสอบเทียบ (Calibration) 29
ภาพที่ 28 ลักษณะ spectrum รวม และ spectrum ของแต่ละ reference mass 30
ภาพที่ 29 การบันทึกผลการสอบเทียบ (Calibration) 31
ภาพที่ 30 ตำแหน่ง A12 ที่ใช้ทำการสอบเทียบและปุ่ม Calibrate สำหรับทำการสอบเทียบแบบย่อ 32
ภาพที่ 31 ผลการสอบเทียบ (Calibration) 33
ภาพที่ 32 การทำความสะอาดแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ (Laser source cleaning) 35

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การแปลผลการวิเคราะห์ชนิดเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper 25
ตารางที่ 2 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข 37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีภารกิจและความรับผิดชอบในการพิสูจน์และจำแนกชนิดของเชื้อจุลชีพ (Microbial identification) ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ ทั้งชนิดที่ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและชนิดที่ไม่ก่อโรค เช่น เชื้อจากสิ่งแวดล้อม (สนับสนุนงานวิจัยและงานสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล) การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial Susceptibility Test) และการตรวจทางจุลทรรศน์ศาสตร์ (Microscopic examination)

การจำแนกชนิดของเชื้อจุลชีพจากสิ่งส่งตรวจประเภทต่าง ๆ นั้น มีหลากหลายวิธี เช่น วิธีดั้งเดิม (Conventional method) เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) และใช้ในงานประจำวัน โดยการบ่มเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งให้เจริญเติบโตอย่างน้อย 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การย้อมสีแกรม (Gram stain) การทดสอบด้วยออกซิเดส (Oxidase) คาตาเลส (Catalase) เพื่อแยกกลุ่มของแบคทีเรียในเบื้องต้น ก่อนจะนำไปทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี (Biochemical test) และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 24 - 48 ชั่วโมง ต้องมีการควบคุมคุณภาพของการทดสอบ การจัดเตรียมอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี ซึ่งต้องปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติของ The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) ทั้งต้องใช้เชื้อแบคทีเรียตามมาตรฐานที่ CLSI กำหนดสายพันธุ์มาตรฐาน American Type Culture Collection (ATCC) เพื่อควบคุมคุณภาพในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลชีพ (1, 2)

ต่อมามีการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูป (Test kit) ซึ่งยังคงอาศัยหลักการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ในหนึ่งชุดมีหลายการทดสอบ มีการควบคุมคุณภาพ ข้อดีคือประหยัดทรัพยากร ลดต้นทุน แต่ยังคงใช้บุคลากรในการอ่านและแปลผลการทดสอบ ต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญในการอ่านผลและใช้เวลาการทดสอบนานหลายชั่วโมง ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ (Automatic identification) เพื่อใช้ในการอ่านผลการทดสอบแทนการใช้บุคลากร ซึ่งแต่ละเครื่องมีหลักการและกระบวนการทำงานที่แตกต่างกัน หลากหลายขั้นตอน ข้อดีคือเครื่องสามารถอ่านและแปลผลให้โดยอัตโนมัติ แต่ยังคงต้องใช้เวลานานหลายชั่วโมง รวมถึงข้อจำกัดในด้านอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี รวมทั้งตัวเครื่องมือที่ต้องทำการบำรุงรักษา

ในปัจจุบันมีการนำ เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจที่ใช้หลักการคัดแยกมวลต่อประจุ (m/z) โดยการนำโคโลนีแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยวิธีมาตรฐานมาทดสอบด้วยเมทริกซ์และทำให้แตกตัวเป็นไอออนวิ่งไปในเครื่องทำการวัดมวลต่อประจุออกมา โดยผลการจำแนกนั้นจะได้จากการเปรียบเทียบ โปรตีนแมสสเปกตรัมของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้กับโปรตีนแมสสเปกตรัมของแบคทีเรียมาตรฐานในฐานข้อมูล (Library) ที่ได้รับการปรับปรุงให้ทันสมัย ใช้ซอฟต์แวร์ที่มาพร้อมกับชุดเครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติ เนื่องจากวิธีการนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างจำเพาะ มีความถูกต้องและแม่นยำ มีขั้นตอน

การทำงานที่ง่าย ใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียงสามถึงห้านาทีก็สามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ รวมถึงเชื้อที่จำแนกได้ยากด้วยการทดสอบทางชีวเคมี เช่น *Leptospira* spp., *Helicobacter* spp. เป็นต้น

การตรวจทางจุลชีววิทยานั้นเป็นการตรวจวินิจฉัยเชื้อจุลชีพก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในร่างกายของมนุษย์ การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็วจะช่วยให้แพทย์นำผลที่ได้ไปประกอบการวินิจฉัยและให้ยาต้านจุลชีพที่ถูกต้องและเหมาะสมกับคนไข้ ด้วยเหตุผลที่ได้กล่าวมาดังข้างต้น ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาจึงได้ตระหนักถึงความสำคัญดังกล่าว จึงได้พิจารณาจากการศึกษาข้อมูล ความไว ความจำเพาะ ความปลอดภัย ความรวดเร็ว และการสนับสนุนงานวิจัยที่จะเกิดขึ้นในอนาคต ตลอดจนนโยบายและพันธกิจของมหาวิทยาลัย การเล็งเห็นความสำคัญและประโยชน์ที่ได้รับทั้งจากผู้บริหารองค์กรและหน่วยงาน จึงได้จัดซื้อเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper มาใช้ในงานประจำวันตั้งแต่วันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2558 จนถึงปัจจุบัน ดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานจึงมีความจำเป็นต้องทราบหลักการและคุณสมบัติของเครื่องมือ วิธีการใช้งานและการบำรุงรักษา เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างถูกต้อง เกิดประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่ออธิบายหลักการและคุณสมบัติของเครื่อง MALDI Biotyper ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ

1.2.2 เพื่ออธิบายขั้นตอนการใช้เครื่อง MALDI Biotyper ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ

1.2.3 เพื่อเสนอประเด็นปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไขในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ผู้ปฏิบัติงานศึกษาหาความรู้เบื้องต้นและรายละเอียดในการใช้งานเครื่อง MALDI Biotyper ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม เกิดประสิทธิภาพสูงสุด และมีความปลอดภัยทั้งต่อตัวผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม

1.3.2 ผู้ปฏิบัติงานสามารถใช้คู่มือนี้เป็นเอกสารอ้างอิงในการปฏิบัติงานการใช้เครื่อง MALDI Biotyper ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ

1.4 ขอบเขตของคู่มือการปฏิบัติงาน

คู่มือการปฏิบัติงานการตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper ฉบับนี้อธิบายถึงหลักการและคุณสมบัติของเครื่องมือ วิธีการใช้งานพื้นฐาน การบำรุงรักษา และข้อควรระวังต่าง ๆ สำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

1.5 คำจำกัดความเบื้องต้น

1.5.1 เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) เป็นเทคนิคการตรวจที่ใช้หลักการคัดแยกมวลต่อประจุ (m/z) โดยการนำโคโลนีแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยวิธีมาตรฐานมาทดสอบด้วยเมทริกซ์และทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนวิ่งไปในเครื่องและทำการวัดมวลต่อประจุออกมาในระบบสุญญากาศ

1.5.2 กรดฟอร์มิก (Formic acid) เป็นกรดคาร์บอกซิลิกชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน มีสูตรโมเลกุล CH_2O_2 ใช้สำหรับทำลายผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง

1.5.3 HCCA (Alpha-4-cyano-4-hydroxycinnamic acid) เป็นสารละลายเมทริกซ์ ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยในการดูดกลืนพลังงานความร้อนจากแสงเลเซอร์ก่อนแล้วถ่ายเทประจุและพลังงานไปยังโมเลกุลของสาร เกิดเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่างในสภาวะแก๊ส

1.5.4 TFA (Trifluoroacetic acid) เป็นตัวทำละลายที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย HCCA และ BTS

1.5.5 Bruker Bacterial Test Standard (BTS) เป็นเชื้อมาตรฐานสกัดมาจาก *Escherichia coli* DH5 alpha สารสกัดนี้จะแสดงเปปไทด์และโปรไฟล์โปรตีนที่มีลักษณะเฉพาะในมวลสเปกตรัมของ MALDI-TOF

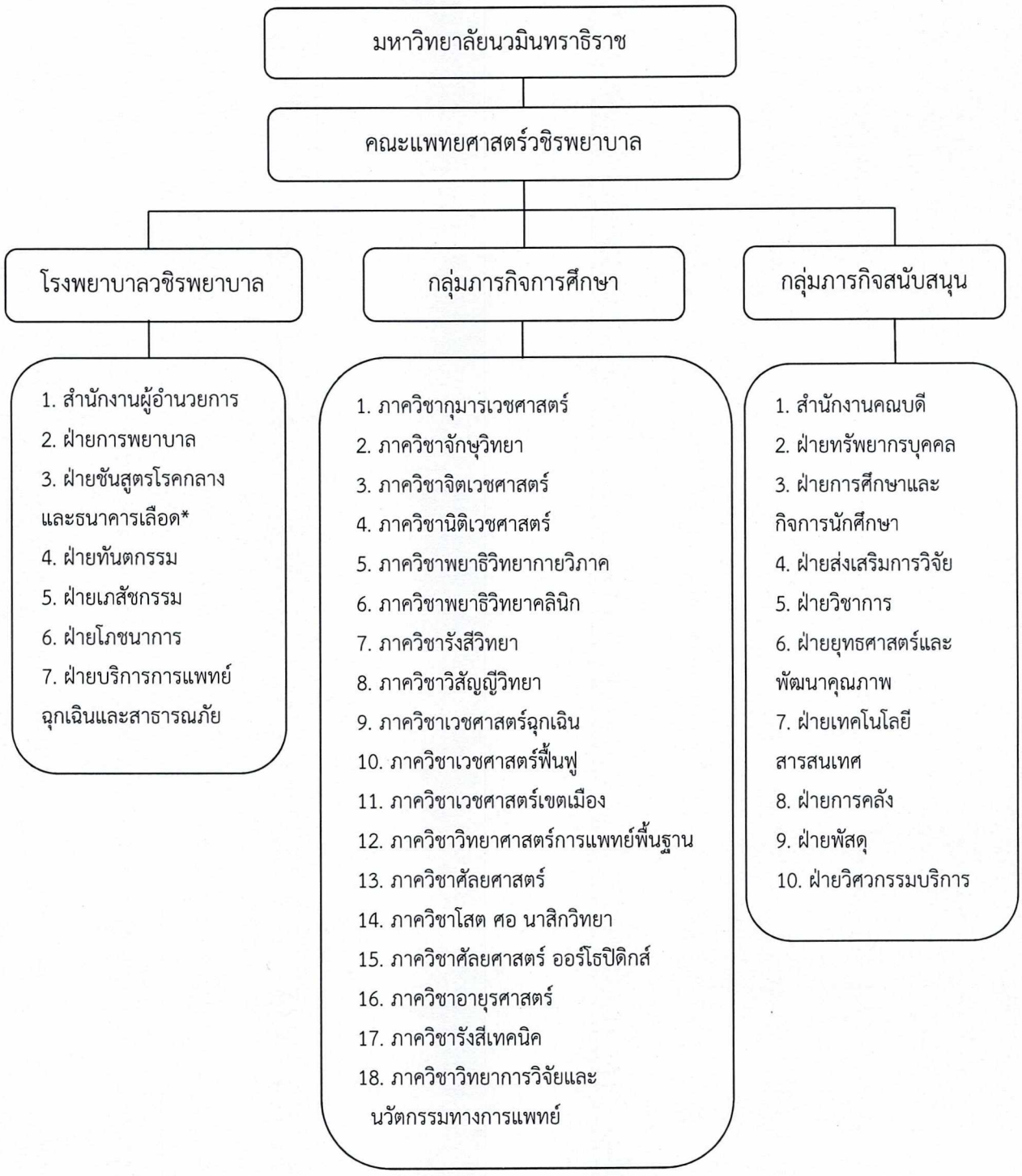
บทที่ 2
โครงสร้างและหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 โครงสร้างคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช เป็นสถาบันการศึกษาระดับอุดมศึกษาที่เป็นหน่วยงานของรัฐในกำกับของกรุงเทพมหานคร มีฐานะเป็นนิติบุคคลและเป็นสถาบันอุดมศึกษาท้องถิ่นแห่งแรกของประเทศไทย ตามประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ 20 มิถุนายน พ.ศ. 2556

คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาลมีภาระหน้าที่และความรับผิดชอบเกี่ยวกับการบริหารทางด้านการศึกษา การควบคุมการสอน และการจัดการศึกษาเพื่อผลิตบัณฑิตและบุคลากรทางการแพทย์ทุกระดับ ตลอดจนผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางหลายสาขา พัฒนาหลักสูตรและปรับปรุงการศึกษาทางการแพทย์ให้ได้มาตรฐานสากล ส่งเสริม สนับสนุน ค้นคว้า และวิจัยทางการแพทย์ การให้บริการทางการแพทย์ที่มีคุณภาพแก่ประชาชน ด้านการบำบัด การส่งเสริมสุขภาพอนามัยและป้องกันโรค และให้บริการทางวิชาการแก่สังคมตลอดจนการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม จารีตประเพณี ภูมิปัญญาท้องถิ่น สิ่งแวดล้อม กีฬา ค่านิยมอันดีงามของไทยและวัฒนธรรมองค์กร รวมทั้งภาระหน้าที่อื่นตามที่สภามหาวิทยาลัยหรืออธิการบดีมอบหมาย

โครงสร้างการบริหารคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล ตามข้อบังคับมหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ว่าด้วยการแบ่งหน่วยงานภายในของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล พ.ศ. 2557 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มงานที่สำคัญ ได้แก่ 1) โรงพยาบาลแบ่งออกเป็น 7 ฝ่าย 2) กลุ่มภารกิจสนับสนุนแบ่งออกเป็น 10 ฝ่าย และ 3) กลุ่มภารกิจการศึกษาแบ่งออกเป็น 18 ภาควิชา ดังแผนภูมิที่ 2.1



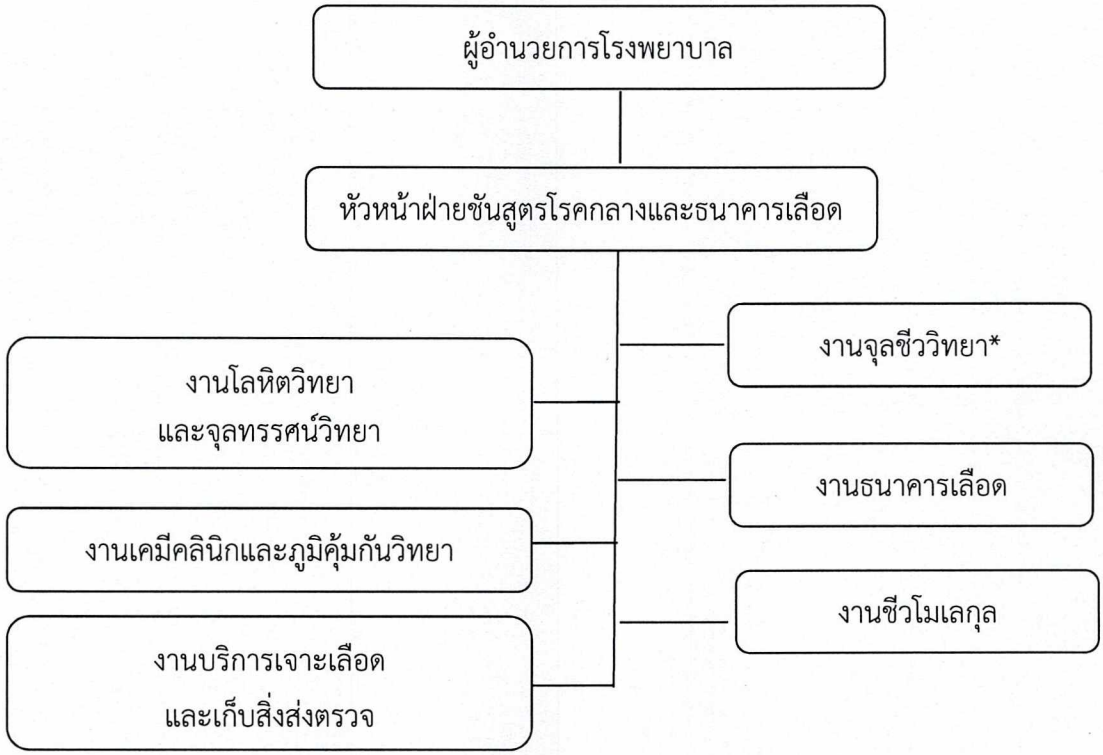
แผนภูมิที่ 2.1 โครงสร้างคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

* ผู้นิพนธ์ปฏิบัติงานอยู่ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

2.2 โครงสร้างการบริหารจัดการฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด เป็นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์และธนาคารเลือด สังกัดโรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ทำหน้าที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์แก่ผู้ป่วยที่มารับบริการ รวมทั้งให้การสนับสนุนการทำงานวิจัยและการเรียนการสอนขององค์กร ในการบริหารจัดการของฝ่ายชันสูตรโรคและธนาคารเลือดทั้งหมด 6 งาน ได้แก่ งานโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์วิทยา งานเคมีคลินิกและภูมิคุ้มกันวิทยา งานบริการเจาะเลือดและเก็บสิ่งส่งตรวจ งานจุลชีววิทยา งานธนาคารเลือดและงานชีวโมเลกุล ตามคำสั่งแต่งตั้งหัวหน้างานของฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด ที่ พวช. 13/518 ลงวันที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2563

สำหรับงานจุลชีววิทยา อยู่ในการดูแลและความรับผิดชอบของกลุ่มงานโรงพยาบาลสังกัดฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล ดังแผนภูมิที่ 2.2



แผนภูมิที่ 2.2 โครงสร้างการบริหารฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

* ผู้นิพนธ์ปฏิบัติงานอยู่ที่งานจุลชีววิทยา

2.3 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของงานจุลชีววิทยา

งานจุลชีววิทยา (ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2.2) เป็นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านจุลชีววิทยา ทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพก่อโรคชนิดที่ใช้ออกซิเจนจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย มีเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่ทันสมัย ให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วทันตามกำหนดเวลามีความถูกต้อง แม่นยำ ได้มาตรฐาน ซึ่งผ่านการรับรองในระดับมาตรฐานสากล ISO 15189:2012 และ ISO 15190:2020 ตลอดจนมุ่งหวังเพื่อให้การสนับสนุนบริการทางการแพทย์แบบก้าวหน้าโดยพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เป็นแหล่งรวมการศึกษาและงานวิจัยทางด้านจุลชีววิทยาคลินิก งานจุลชีววิทยา แบ่งตามภาระงานออกเป็น 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

2.3.1 งานบริการทางคลินิก มีภารกิจ ดังนี้

1) การตรวจวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ได้แก่ การย้อมสี Gram stain, Acid fast stain และ Modified acid fast stain

2) การตรวจวิเคราะห์จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรง (Direct examination) ได้แก่ KOH preparation, India Ink preparation และ Wet smear

3) การเพาะเชื้อเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อราชนิดยีสต์จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ตลอดจนทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อรายงานผลกลับไปยังผู้รับบริการ เช่น แพทย์ หรือพยาบาล เพื่อทำการดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป

2.3.2 งานบริการทางวิชาการและงานวิจัย มีภารกิจ ดังนี้

1) สนับสนุนให้ข้อมูลเชิงวิชาการและเป็นแหล่งฝึกงานทางด้านห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกแก่นักศึกษาเทคนิคการแพทย์และบุคลากรผู้สนใจ

2) สนับสนุนข้อมูลเชิงสถิติ ทางด้านระบาดวิทยาโรคติดเชื้อแบคทีเรียและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการติดตามแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพ

3) สนับสนุนและเสริมสร้างงานวิจัย โดยทำงานวิจัยร่วมกับทีมสหสาขาวิชาชีพที่หลากหลาย (แพทย์ นักศึกษาแพทย์ พยาบาล และผู้ที่สนใจงานทางด้านจุลชีววิทยา) เช่น การศึกษาการกระจายของเชื้อชนิดต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมของโรงพยาบาล การศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของเชื้อที่พบในโรงพยาบาล รวมถึงเป็นแหล่งรองรับงานวิจัยในรูปแบบต่าง ๆ สำหรับนักวิจัยที่ต้องการทำการศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาคลินิกทั้งภายในและภายนอกองค์กร

4) สนับสนุนและให้คำปรึกษาทางวิชาการ งานบริการ งานคุณภาพแก่มหาวิทยาลัยและโรงพยาบาลต่าง ๆ

5) สนับสนุนและให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เชื้อในห้องปฏิบัติการแก่นักวิจัยทั้งภายในและภายนอก

2.3.3 งานระบาดวิทยา มีภารกิจ ดังนี้

1) ร่วมสอบสวนแหล่งระบาดของเชื้อก่อโรค เชื้อดื้อยาที่ต้องเฝ้าระวัง ค้นหาสาเหตุและแหล่งกำเนิดของแบคทีเรีย ทั้งในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

2) รายงานการตรวจพบเชื้อดื้อยาในผู้ป่วยต่อหอผู้ป่วยและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องให้รับทราบ โดยเป็นการทำงานประสานกันกับทีมสหสาขาวิชาชีพ เพื่อร่วมกันวางแนวทางสำหรับควบคุมและป้องกันการระบาดของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล

3) ประสานกับงานควบคุมโรคติดเชื้อเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลและสืบสานนโยบายต่าง ๆ ร่วมกันกับกลุ่มงานควบคุมโรคติดเชื้อ

2.4 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งและลักษณะงานที่ปฏิบัติ

ผู้นิพนธ์ปัจจุบันดำรงตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ระดับปฏิบัติการ (ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12290) สังกัดฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด โรงพยาบาลวชิรพยาบาล คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ปฏิบัติงานประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ในระดับปฏิบัติการ ที่ต้องใช้องค์ความรู้ รวมทั้งทักษะวิชาชีพด้านเทคนิคการแพทย์ภายใต้การกำกับ แนะนำและตรวจสอบ โดยผู้บังคับบัญชา ให้เป็นไปตามาตรฐานวิชาชีพเทคนิคการแพทย์และมาตรฐานงานขององค์กร มีหน้าที่หลักในการบริการงานด้านจุลชีววิทยาและรับผิดชอบในตำแหน่งคณะกรรมการต่าง ๆ ตามที่ได้รับมอบหมายจากหน่วยงาน ดังต่อไปนี้

2.4.1 ด้านการปฏิบัติการ เป็นผู้รับผิดชอบในการปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา มีหน้าที่ดังนี้

1) ปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการขั้นพื้นฐาน ควบคุมระบบคุณภาพตามมาตรฐานงานเทคนิคการแพทย์ เพื่อให้ผู้รับบริการได้รับผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และทันเวลา

2) รวบรวมข้อมูลทางวิชาการเบื้องต้นด้านเทคนิคการแพทย์ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเพื่อประกอบการวางแผนหรือจัดทำรายงานทางวิชาการ เพื่อพัฒนางานด้านเทคนิคการแพทย์และสาธารณสุข

3) ติดตามประเมินผลและสรุปการศึกษา วิเคราะห์ และวิจัยด้านเทคนิคการแพทย์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของโครงการที่รับผิดชอบ

4) ศึกษาวิเคราะห์ วิจัยสำรวจข้อมูลทางวิชาการเบื้องต้นที่ไม่ซับซ้อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนพัฒนางานด้านเทคนิคการแพทย์และสาธารณสุข

2.4.2 ด้านการวางแผน

ร่วมดำเนินการวางแผนการทำงาน ทั้งการปฏิบัติงานประจำวัน งานในวาระพิเศษต่าง ๆ เช่น การขอรับรองมาตรฐาน ISO การเยี่ยมสำรวจจากภายในหน่วยงานของมหาวิทยาลัย ร่วมกับบุคลากรในหน่วยงานหรือส่วนงานอื่น เช่น งานควบคุมโรคติดเชื้อ หรือโครงการวิจัย เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปตามเป้าหมายและผลสัมฤทธิ์ที่กำหนด

2.4.3 ด้านการประสานงาน ในการปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการประสานงานติดต่อสื่อสาร รายงานข้อมูลต่าง ๆ ร่วมกับหลายฝ่ายทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน จึงได้รับมอบหมายหน้าที่ ดังนี้

1) ประสานงานทำความร่วมมือกับทีมงานโดยมีบทบาทในการชี้แนะ จูงใจ ทีมงานหรือหน่วยงานหรือส่วนงานอื่น เพื่อให้เกิดความร่วมมือและผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนด

2) ชี้แจงให้ข้อคิดเห็นในที่ประชุมคณะกรรมการหรือคณะทำงานต่าง ๆ เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์และเกิดความร่วมมือในการดำเนินงานร่วมกัน

3) ประสานงานองค์กรภายในโรงพยาบาล เช่น งานพัสดุ งานเครื่องมือแพทย์ งานช่างและซ่อมบำรุง รวมถึงองค์กรหรือบริษัท ผู้แทนผลิตภัณฑ์ ผู้เชี่ยวชาญผลิตภัณฑ์หรือเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้สามารถใช้งานและปฏิบัติงานกับผลิตภัณฑ์หรือเครื่องมือได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

2.4.4 ด้านการบริการ ให้บริการตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาแก่แพทย์และพยาบาลหน่วยงานอื่น ๆ ของโรงพยาบาล ดังนี้

1) ปฏิบัติงานประจำในงานจุลชีววิทยาตามตำแหน่งหน้าที่ที่รับผิดชอบ มีหน้าที่ให้บริการตรวจในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

2) ให้บริการตรวจทางจุลชีววิทยาของโครงการต่าง ๆ ของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช เช่น โครงการตรวจสุขภาพประจำปีของนักศึกษา พนักงาน ข้าราชการ และแรงงานต่างด้าว เป็นต้น

3) ให้บริการงานเฝ้าระวังและควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาล รายงานเชื้อดื้อยาเพื่อจัดทำข้อมูลเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล (Antibiogram)

4) ควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลตรวจตามมาตรฐาน เชื่อถือได้ ทำการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC) ทุกรายการวิเคราะห์และทำการบำรุงรักษาเครื่องตรวจอัตโนมัติตามตารางการบำรุงรักษาเครื่อง

2.4.5 ด้านวิชาการ สนับสนุนและให้ความรู้ด้านจุลชีววิทยา ดังนี้

1) รับผิดชอบในการสอนและควบคุมการฝึกงานภาคปฏิบัติของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ได้แก่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต มหาวิทยาลัยมหิดล และ/หรือ สถาบันต่าง ๆ ที่ขอดูงานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

2) ตรวจสอบประสิทธิผลการทำงานของเครื่องมือที่ใช้ภายในห้องปฏิบัติการ

3) ให้คำปรึกษา แนะนำ แก้ปัญหาและตัดสินใจเกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาให้กับบุคลากรในหน่วยงาน นอกหน่วยงาน นอกฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด รวมถึงผู้ที่มาใช้บริการต่าง ๆ

4) ประสานงานกับหน่วยงานอื่น ๆ เช่น หอผู้ป่วย ให้ความรู้เกี่ยวกับการเก็บสิ่งส่งตรวจ ผลการตรวจ และปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจนั้น ๆ

5) ทำการศึกษา อบรม เพิ่มเติมความรู้ทางด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้านคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านบริการและงานด้านบริหารให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.4.6 ด้านบริหาร มีหน้าที่และความรับผิดชอบให้การบริหารจัดการทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน ดังนี้

1) รับผิดชอบงานในงานจุลชีววิทยา ควบคุมและดูแลการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ระดับรองให้ดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ

2) ร่วมจัดวางแผนงานในงานจุลชีววิทยา เพื่อให้มีการพัฒนาในด้านความรู้แก่บุคลากรในหน่วยงาน รวมทั้งร่วมแก้ไขปัญหาจากการปฏิบัติงานและปัญหาจากการใช้เครื่องมือทางการแพทย์ภายในห้องปฏิบัติการเบื้องต้น

3) รับผิดชอบในการจัดเตรียมสารเคมี น้ำยาสำเร็จรูปและวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสมและเพียงพอต่อการปฏิบัติงานอย่างต่อเนื่อง

4) บริหารจัดการเครื่องมือแพทย์ ภายในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ในด้านการจัดหา การเตรียมความพร้อม การบำรุงรักษาและทวนสอบ รวมถึงการซ่อมบำรุงเบื้องต้น เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปด้วยความเรียบร้อย

2.4.7 ปฏิบัติงานในตำแหน่งคณะกรรมการต่าง ๆ

ผู้นิพนธ์ปฏิบัติหน้าที่นักเทคนิคการแพทย์ระดับปฏิบัติการ มีหน้าที่หลักในการตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาและให้บริการด้านการแพทย์แล้วนั้น นอกจากนี้ยังมีหน้าที่และบทบาทความรับผิดชอบในตำแหน่งคณะกรรมการต่าง ๆ ตามที่ได้รับมอบหมายจากทางมหาวิทยาลัย ดังนี้

1) งานคณะกรรมการคัดเลือกเวชภัณฑ์และครุภัณฑ์ทางการแพทย์ มีหน้าที่ในการจัดหา คัดเลือก และกำหนดคุณสมบัติ วัสดุอุปกรณ์ น้ำยาและสารเคมี เครื่องมือและเครื่องตรวจวิเคราะห์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติงานจุลชีววิทยา

2) งานคณะกรรมการเครื่องมือแพทย์ของหน่วยงาน เป็นผู้รับผิดชอบหลักในการวางแผนการบริหารจัดการด้านเครื่องมือห้องปฏิบัติการร่วมกับทีมเครื่องมือแพทย์ของฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด ในการจัดทำแผนการดูแล บำรุงรักษา การซ่อม การสอบเทียบและทบทวนผลสอบเทียบตามมาตรฐาน การเยี่ยมสำรวจ ให้เป็นไปตามข้อกำหนดของ ISO 15189:2007 และ ISO 15190:2020 และวางแผนดำเนินงานร่วมกับหน่วยงานเครื่องมือแพทย์ของโรงพยาบาลในการจัดทำทะเบียนเครื่องมือแพทย์ของหน่วยงาน จัดทำโปรแกรมบำรุงรักษา โปรแกรมสอบเทียบ จัดทำแผนเครื่องมือเมื่อเกิดข้อบกพร่องและมีมาตรการแก้ไขและป้องกันการเกิดซ้ำของเครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงให้การเยี่ยมสำรวจศึกษาดูงานของหน่วยงานเครื่องมือแพทย์เพื่อเตรียมการขอรับรอง ISO 17025:2017

3) งานคณะกรรมการตรวจสอบพัสดุ ทำหน้าที่ตรวจสอบพัสดุและครุภัณฑ์ภายในและนอกหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายตามคำสั่งของมหาวิทยาลัย เช่น การตรวจสอบทรัพย์สิน ตู้ โต๊ะ เครื่องมือ เครื่องใช้ เครื่องมือแพทย์ เครื่องตรวจวิเคราะห์ทางการแพทย์ให้เป็นไปตามทะเบียนทรัพย์สิน

4) การจัดทำ ทบทวน เอกสารวิชาการเกี่ยวกับเครื่องมือของหน่วยงานเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐาน ISO 15189:2007 และ ISO 15190:2020

บทที่ 3
การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Microflex ผลิตโดย Bruker Daltonics (ประเทศเยอรมัน) (ภาพที่ 1) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ยีสต์ ราสาย (Filamentous Fungi) และ Mycobacterium โดยใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass spectrometry หรือ MS) ในการตรวจวัดหาค่ามวลโมเลกุลและโครงสร้างของโปรตีนของเชื้อ เพื่อนำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในคลังข้อมูล (Library) ทำให้ทราบถึงชนิดของเชื้อเหล่านั้นในเวลาเพียงไม่กี่นาทีหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้สามารถตรวจได้ถึงระดับสปีชี่ส์ (Species) และแยกความแตกต่างระหว่างสปีชี่ส์ที่มีความใกล้กันหรือแยกซับสปีชี่ส์ซึ่งไม่สามารถแยกโดยการทดสอบทางชีวเคมีได้ (3)

ภาพที่ 1 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Microflex (ประเทศเยอรมัน)

เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass spectrometry) เป็นเทคนิคการตรวจวัดเทคนิคหนึ่งที่ใช้หลักการคัดแยกมวลต่อประจุ (m/z) โดยการแยกที่เกิดขึ้นนี้จะแสดงผลออกมาในรูปของสเปกตรัมของมวล (Mass spectrum) ซึ่ง plot ค่าระหว่าง response ที่ตรวจวัดได้กับ m/z โดยค่า response ที่ตรวจวัดได้จะแสดงออกมาในรูปของ relative abundance (4, 5)

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) เป็นเทคนิคการทำให้สารเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization) โดยใช้เมทริกซ์ดูดซับพลังงานเลเซอร์เพื่อสร้างไอออนจากโมเลกุลขนาดใหญ่โดยมีการกระจายตัวน้อยที่สุด ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องวัดมวลโมเลกุล (Mass Spectrometer) ส่วน Time Of Flight (TOF) เป็น Mass Analyzer ที่ใช้หลักการการให้พลังงานกับไอออนเพื่อให้ไอออนเกิดการเคลื่อนที่ไปตามระยะทางที่กำหนด การคัดแยก m/z สามารถทำได้จากการตรวจวัดระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของแต่ละไอออนเข้าสู่ส่วนตรวจวัด (Detector) ซึ่งไอออนที่มีมวลมากจะใช้เวลามาก ในขณะที่ไอออนที่มีมวลน้อยจะใช้เวลาในการเคลื่อนที่น้อยกว่า

MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมอย่างแพร่หลายเพื่อประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecules) ชนิดอื่น ๆ เช่น โพลีแซคคาไรด์ ไขมัน ไกลโคโปรตีน รวมถึงสารโมเลกุลขนาดเล็ก (Small molecules) และสารประกอบโลหะเชิงซ้อนบางชนิด รวมถึงการวินิจฉัยจำแนกชนิดของแบคทีเรียและราโดยเฉพาะยีสต์ มีประโยชน์อย่างยิ่งในกรณีที่ต้องการการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ใช้ง่าย ไม่ซับซ้อน

3.1 หลักการและคุณสมบัติของเครื่อง MALDI Biotyper

3.1.1 หลักการทำงานของเครื่อง MALDI Biotyper

เครื่อง MALDI Biotyper อาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS ซึ่งมีหลักการประกอบด้วย 2 กระบวนการหลัก ๆ ได้แก่ การทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วยเทคนิค MALDI และการตรวจวัดไอออนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวิเคราะห์มวลแบบ Time-of-Flight (TOF) การทำงานเริ่มจากผสมสารละลายสารตัวอย่างกับสารละลายเมทริกซ์ (Matrix) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วหยด (Spot) สารผสมลงบนแผ่นโลหะสำหรับหยดตัวอย่าง (MALDI Target Plate) จากนั้นระเหยตัวทำละลายในสารผสมจนแห้งเกิดเป็นผลึกระหว่างสารตัวอย่างกับเมทริกซ์ (Co-crystallization) ก่อนนำเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS เมื่อนำ MALDI Target Plate เข้าเครื่องวัดมวลที่ทำให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศจะทำการฉายเลเซอร์ชนิดที่ปล่อยลำแสงออกมาเป็นจังหวะ โดยทั่วไปมักเป็นเลเซอร์ในช่วงความยาวคลื่นอัลตราไวโอเลต (Pulsed UV laser) ลงบน Sample spot ของผลึกสารผสม เมทริกซ์ซึ่งมีปริมาณมากกว่าและดูดกลืน (Absorb) แสงเลเซอร์ได้ดีกว่าสารที่สนใจ จะถูกกระตุ้นด้วยพลังงานความร้อนจากแสงเลเซอร์ทำให้ชั้นโมเลกุลเมทริกซ์ถูกไอออไนซ์ในสภาวะแก๊สได้ก่อนสารตัวอย่าง ในขณะเดียวกัน เมทริกซ์ไอออนจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางถ่ายเทประจุหรือโปรตอนและพลังงานไปยังโมเลกุลของสารตัวอย่าง ทำให้สารที่สนใจแตกตัวเป็นไอออนในสภาวะแก๊สได้ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Desorption/Ionization ซึ่งเกิดขึ้นที่ชั้นผลึกในระดับไมโครเมตรในช่วงเวลานาโนวินาที จากนั้นไอออนเหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปในท่อสุญญากาศและถูกตรวจวัดด้วยเครื่องวัดมวลแบบ Time-of-Flight (TOF) โดยความเร็วในการเคลื่อนที่ของไอออนขึ้นอยู่กับขนาดของมวลต่อประจุ (m/z) กล่าวคือไอออนของสารใดที่มีมวลน้อยจะสามารถเคลื่อนที่ในท่อสุญญากาศ (TOF tube) ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลมาก จึงเดินทางไปยังส่วนตรวจวัด (Detector) ได้ก่อนทำให้สามารถตรวจวัดระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ (Time of Flight) และคำนวณขนาดมวลสารได้รวมถึงแสดงผลออกมาในรูปสเปกตรัมมวลต่อประจุของสาร (Mass spectrum) (6)

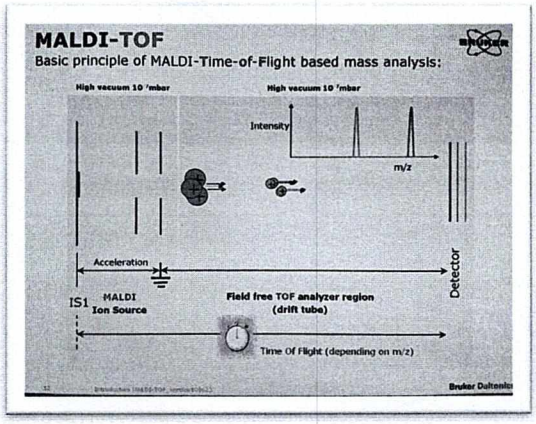
3.1.2 ส่วนประกอบที่เกี่ยวข้องในการทำงานของเครื่อง MALDI Biotyper

เครื่อง MALDI Biotyper มีส่วนประกอบในการทำงานที่อาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS องค์ประกอบชุดวิเคราะห์มี 3 ส่วนหลัก ได้แก่ แหล่งกำเนิดไอออน (Ion source) ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) และส่วนตรวจวัด (Detector) ดังนี้

1) แหล่งกำเนิดไอออน (Ion source) แบบ MALDI เป็นบริเวณทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน เริ่มจากการฉาย pulsed UV laser ลงบนผิวของตัวอย่างบน MALDI Target Plate ซึ่งอยู่ในระบบสุญญากาศสูง (High vacuum) ที่มีความดันระดับต่ำ 10^{-3} – 10^{-7} mbar และควบคุม electrostatic field ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนในสภาวะแก๊ส แล้วเคลื่อนที่ไปเกิดการแยกในส่วนวิเคราะห์ไอออนต่อไป

2) ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) แบบ TOF analyzer โดยทั่วไปมี 2 แบบ ได้แก่ Linear TOF analyzer และ Reflectron TOF analyzer ในที่นี้ขออธิบายหลักการเบื้องต้นของ Linear TOF analyzer คือ เมื่อไอออนเคลื่อนที่สู่ TOF tube ในภาวะสุญญากาศ ในช่วงต้นไอออนจะถูกเร่งโดยพัลส์ของสนามไฟฟ้าด้วยความต่างศักย์ประมาณ 20 kV จนมีความเร็วค่าหนึ่ง (v) ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของมวลต่อประจุ (m/z) ของไอออน และปล่อยให้ไอออนเคลื่อนที่หรือบิน (Fly) อย่างอิสระผ่านบริเวณที่ปราศจากอิทธิพลของสนามไฟฟ้า (Electric-field-free region) หรือ Drift zone (Flight path) เป็นระยะทาง d ในเวลาหนึ่ง (t) โดยระยะเวลาในการบินจะสั้นในระดับไมโครวินาที ก่อนถึงเครื่องตรวจวัด กล่าวคือไอออนที่มีมวลน้อยจะเคลื่อนที่ไปถึงเครื่องตรวจวัดได้ก่อนไอออนที่มีมวลมากกว่านั่นเอง ปกติ TOF tube มีความยาวของส่วน Flight path ประมาณ 1-2 เมตร ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการแยกมวลไอออน (High resolution) และมีความไวสูงในการตรวจวัดไอออน (High sensitivity) โดยจัด TOF อยู่ในกลุ่มเครื่องวิเคราะห์มวลแบบความละเอียดสูง (High resolution MS) ที่สามารถแยกมวลไอออนที่อยู่ติดกันได้และอ่านค่า m/z ของไอออนได้ละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3) ส่วนตรวจวัด (Detector) เป็นส่วนตรวจวัดไอออนที่แยกได้จากส่วน Mass analyzer โดยส่วนใหญ่เป็นประเภทเพิ่มความเข้มหรือขยายสัญญาณแบบ Electron multiplier (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ส่วนประกอบในการทำงานของเครื่อง MALDI Biotyper โดยอาศัยเทคนิค MALDI-TOF MS

3.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Microflex (ประเทศเยอรมัน) มีขั้นตอนและกระบวนการทำงาน ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการใส่ตัวอย่างเข้าในเครื่อง การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม MALDI Biotyper RTC การแปลผลจากเครื่อง MALDI Biotyper การสอบเทียบ (Calibration) และการควบคุมคุณภาพ (7-10) ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างนับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากต้องทำให้ตัวอย่างถูกไอออไนซ์ได้อย่างสมบูรณ์และไม่แตกสลายด้วยเลเซอร์ จึงจะสามารถตรวจวัดและประมวลผลสเปกตรัมมวลต่อประจุของสารได้ชัดเจน เที่ยงตรงและถูกต้องแม่นยำ การเตรียมตัวอย่างที่ดีนั้น จะต้องทำให้สารตัวอย่างในเมทริกซ์เกิดผลึกของแข็งและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอบน MALDI Target Plate เชื้อที่นำมาทดสอบควรเป็นเชื้อที่มีความบริสุทธิ์สูง (Pure colony) และมีอายุการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเพียงพอ

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการใช้ในงานประจำ สามารถทำได้ 3 วิธีได้แก่ Direct Transfer (DT) Method, Extended Direct Transfer และ Formic Acid Extraction

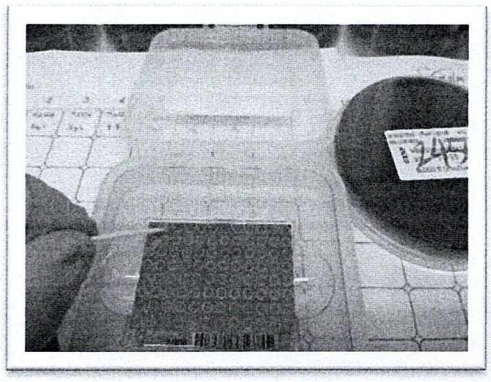
3.2.1.1 Direct Transfer (DT) Method เป็นวิธีที่ใช้ในงานประจำวัน เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก โดยใช้โคโลนีของเชื้อโดยตรง มีขั้นตอนดังนี้

(1) ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาสเมียร์ลง MALDI Target Plate ให้ผิวเรียบบางและสม่ำเสมอเต็มวงแล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งเขียนระบุตำแหน่งในใบ MSP 96 Target (ภาพที่ 3 และภาพที่ 4)

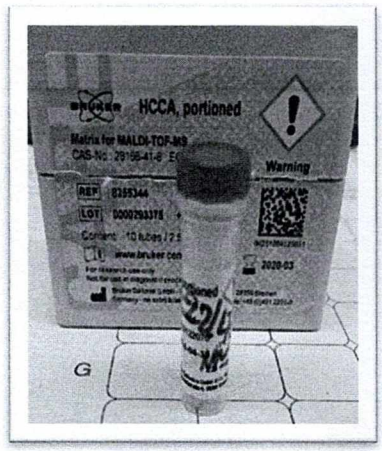
(2) หยดสารละลาย HCCA 1 ไมโครลิตร ลงบนผิวเชื้อที่สเมียร์ในแต่ละหลุม หลังจากนั้นทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 5 และภาพที่ 6)

(3) นำ MALDI Target Plate เข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ MALDI Biotyper

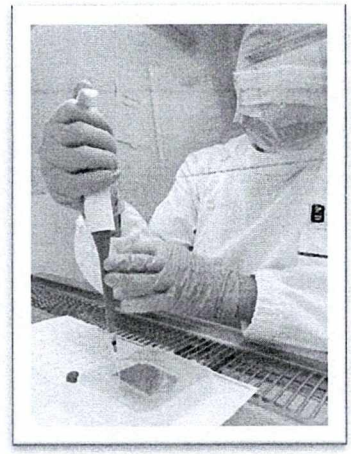
ภาพที่ 3 การเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่



ภาพที่ 4 การสเมียร์โคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบให้บางและสม่ำเสมอเต็มบริเวณทั่วทั้งหลุม



ภาพที่ 5 สารละลาย HCCA



ภาพที่ 6 การหยดสารละลาย HCCA ให้ทั่วบริเวณที่สเมียร์เชื้อให้เต็มพื้นที่หลุมทดสอบ

3.2.1.2 Extended Direct Transfer (EDT) Method เป็นวิธีที่ใช้กับเชื้อจุลชีพที่มีผนังเซลล์ เช่น แกรมบวก หรือยีสต์ อาจใช้กรดฟอร์มิก (70% Formic acid) (ภาพที่ 7) หยดก่อนเพื่อเปิดผนังเซลล์ให้โปรตีนแตกตัวได้ดียิ่งขึ้น ขั้นตอนของวิธีนี้มีดังนี้

(1) ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาสเมียร์ลง MALDI Target Plate พร้อมทั้งเขียนระบุตำแหน่งในใบ MSP 96 Target แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

(2) หยด 70% Formic acid 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

(3) หยดสารละลาย HCCA 1 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

(4) นำ MALDI Target Plate เข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ MALDI Biotyper

ภาพที่ 7 กรดฟอร์มิก (70% Formic acid)

3.2.1.3 Formic Acid Extraction Method วิธีการนี้แนะนำให้ใช้ในกรณีที่เชื้อมีผนังเซลล์ที่หนาค่อนข้างมาก เช่น ยีสต์ เป็นต้น รวมทั้งในกรณีที่ต้องการสร้างสเปกตรัมของเชื้อเพื่อสร้างฐานข้อมูลเชื้อขึ้นมาใหม่ (Library) มีขั้นตอนดังนี้

(1) ใช้เชื้อจำนวน 4-5 โคโลนี มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในหลอด Eppendoft และดูดขึ้นลงประมาณ 20 ครั้ง

(2) เติม Ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเป็นเวลา 1 นาที

(3) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนบนออก

(4) นำไปปั่นอีกครั้ง ความเร็วรอ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนนี้ให้เทสารละลายส่วนบนออกให้หมด เหลือส่วนก้นหลอดไว้ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที

(5) เมื่อแห้งแล้วให้เติม 70% Formic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลง 20 ครั้งและเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที

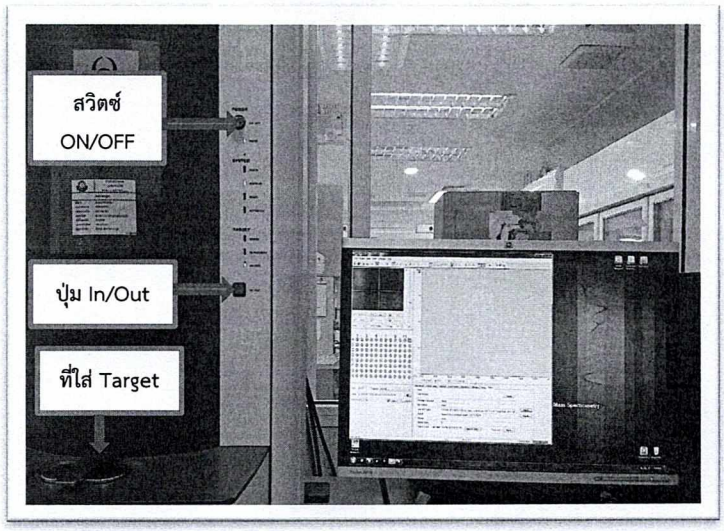
(6) เติมสารละลาย Acetonitrile ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นดูดขึ้นลง 20 ครั้ง แล้วนำไปนำไปปั่น ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

(7) ดูดสารละลายส่วนบนที่ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สเมียร์บน MALDI Target Plate แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

(8) หยดสารละลาย HCCA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บน MALDI Target Plate ทิ้งให้แห้งและนำไปเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ MALDI Biotyper

3.2.2 ขั้นตอนการใส่ตัวอย่างเข้าในเครื่อง MALDI Biotyper มีดังต่อไปนี้

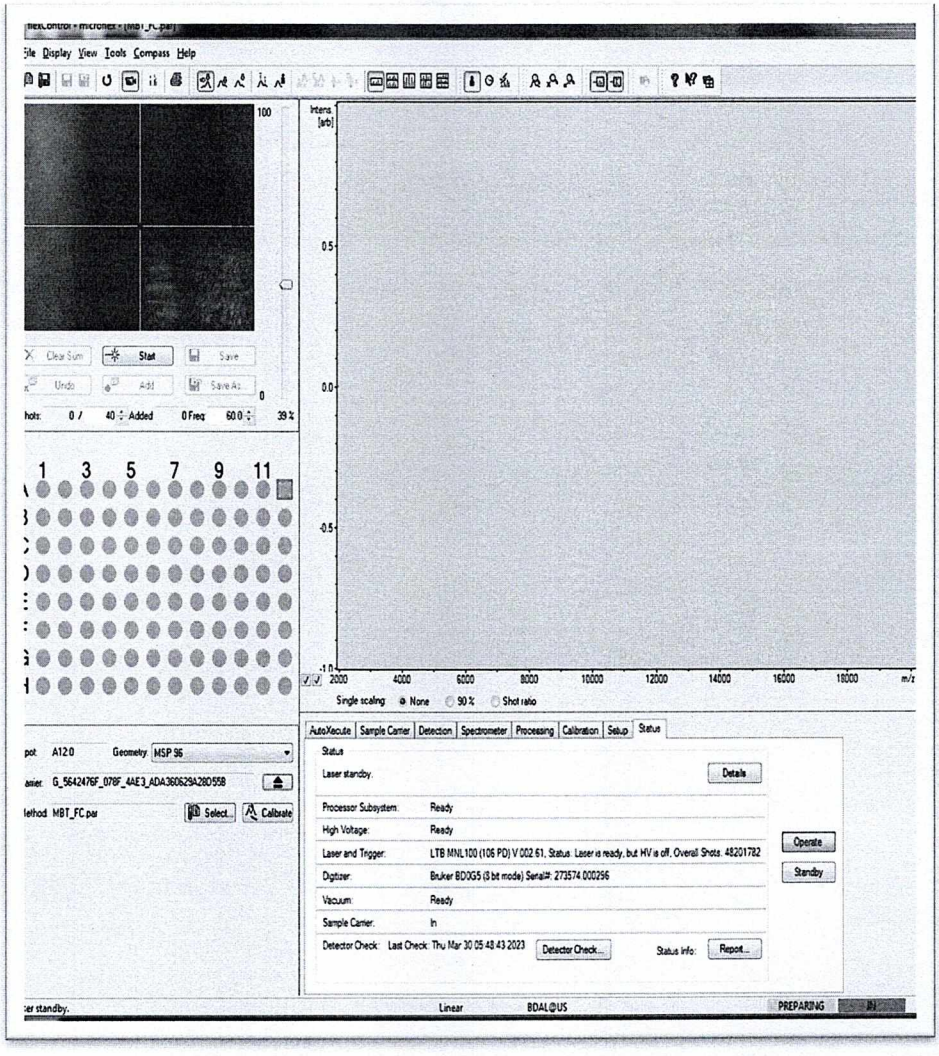
3.2.2.1 การเปิดเครื่อง MALDI Biotyper ให้ทำการเปิดสวิตช์ด้วยกุญแจตรงตำแหน่งปุ่ม ON/OFF ที่ด้านหน้าของตัวเครื่อง (ภาพที่ 8) หลังจากนั้นเปิดคอมพิวเตอร์และตามด้วยจอภาพ



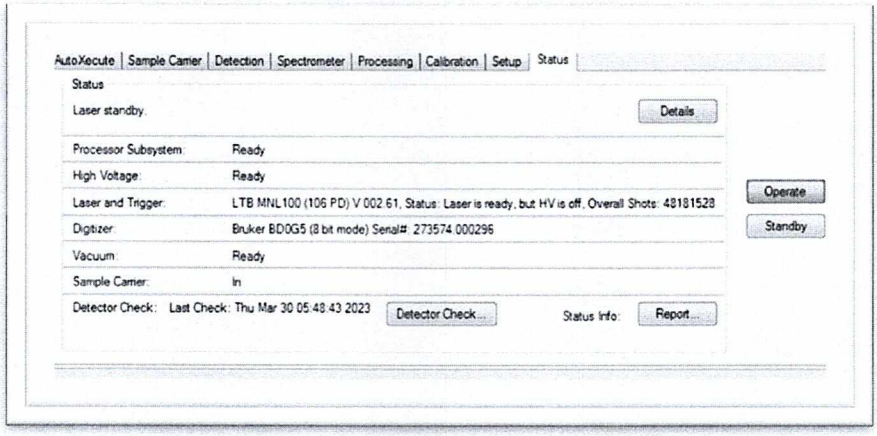
ภาพที่ 8 ตำแหน่งและปุ่มต่าง ๆ ของเครื่อง MALDI Biotyper

ในการเปิดใช้งานเครื่องให้หมุนลูกกุญแจไปที่ตำแหน่ง ON

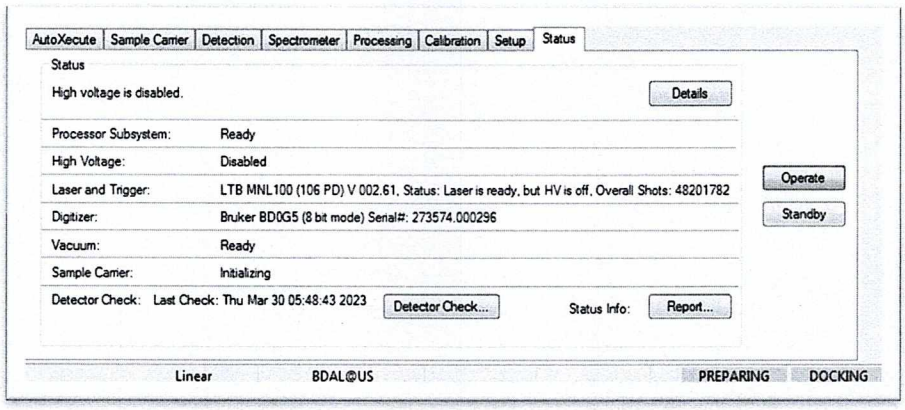
3.2.2.2 ใช้เมาส์คลิกที่ภาพไอคอน FlexControl เพื่อเปิดโปรแกรมที่หน้าจอคอมพิวเตอร์จะปรากฏดังแสดงในภาพที่ 9 สถานะปกติของเครื่องที่พร้อมใช้งาน Target จะอยู่ในตำแหน่ง In (ตำแหน่ง analyze) และ จอภาพแสดงสถานะ Ready ครบทั้ง 3 ตำแหน่งประกอบด้วย Processor Subsystem, High Voltage และ Vacuum (ภาพที่ 10) หากสถานะของไม่พร้อมใช้งาน อยู่ในขณะลดความดัน มีการเคลื่อนที่เข้าหรือออก (Initializing/Docking/Preparing) (ภาพที่ 11) หรือในกรณีที่ลืมนำ Target เข้าไปภายในตัวเครื่องจะยังไม่สามารถใช้งานได้ แนวทางในการแก้ไขคือ ทำให้ Target อยู่ในตำแหน่ง In และรอให้ระบบปรับความดันแสดงสถานะ Ready



ภาพที่ 9 โปรแกรม FlexControl เมื่อเปิดใช้งาน



ภาพที่ 10 จอภาพแสดงสถานะ Processor Subsystem, High Voltage และ Vacuum ของเครื่อง MALDI Biotyper ที่พร้อมทำงาน (Ready)



ภาพที่ 11 จอภาพแสดงสถานะขอเครื่องไม่พร้อมทำงาน มีการเคลื่อนที่เข้าหรือออก (Initializing/Docking Preparing) ของ Target และอยู่ในระหว่างการปรับความดัน (Distabled)

3.2.2.3 ใช้เมาส์คลิกที่ไอคอน ⏏ In/Out บนจอภาพ หรือโดยกดปุ่ม In/Out ของเครื่อง Biotyper เพื่อให้ฐาน Target เคลื่อนออกมาที่ตำแหน่งของ source (Out) ในขณะที่มีการเคลื่อนที่เข้าหรือออกของ Target สถานะหน้าเครื่องจะปรากฏไฟสีเหลืองที่ปุ่ม access และปรากฏไฟสีส้มที่ตำแหน่ง in progress ให้รอจนกระทั่งสถานะหน้าเครื่องครั้งปุ่ม access กลับมาเป็นสีเขียวอีก เมื่อสำเร็จแล้วไฟที่ปุ่ม Out จะติดสีเขียว จะสามารถเปิดประตูและนำ Target วางใส่เข้าไปได้ จากนั้นทำโดยการคลิกที่ ⏏ In/Out บนจอภาพ หรือ กดปุ่ม In/out ที่ตัวเครื่องโดยทันที

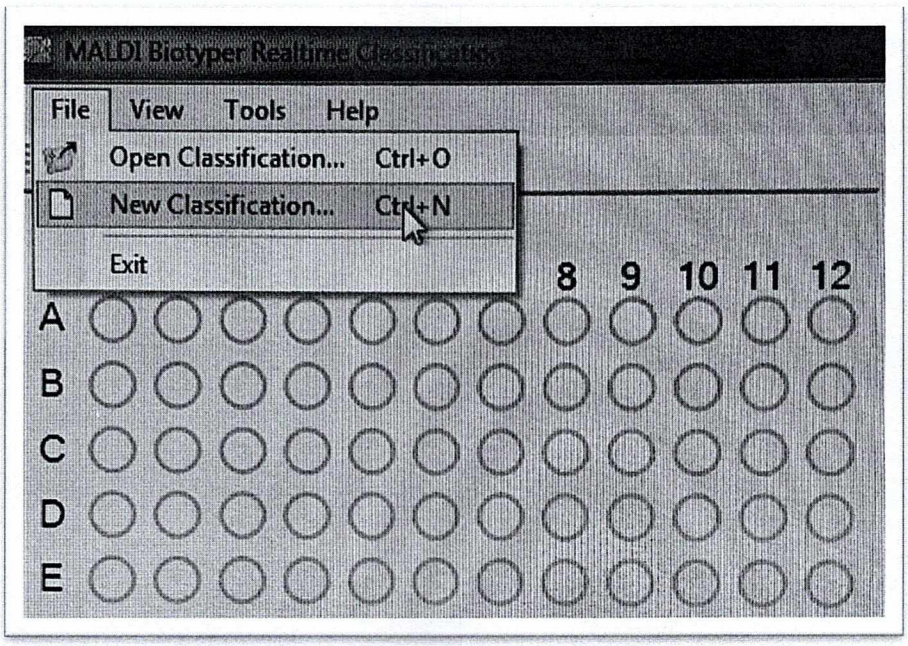
3.2.2.4 เมื่อนำ Target เข้าไปในตัวเครื่อง ระบบจะทำการปรับระดับความดัน (Vacuum pressures) ประกอบด้วย Rock Rough, Source Rough และ Source High เครื่องจะทำการปรับระดับให้อยู่ในช่วงที่กำหนด (Set Point) และปรากฏไฟสีเขียวที่ OK แสดงว่าเครื่องปรับระดับความดันได้เรียบร้อยแล้วและพร้อมใช้งาน

3.2.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม MALDI Biotyper RTC

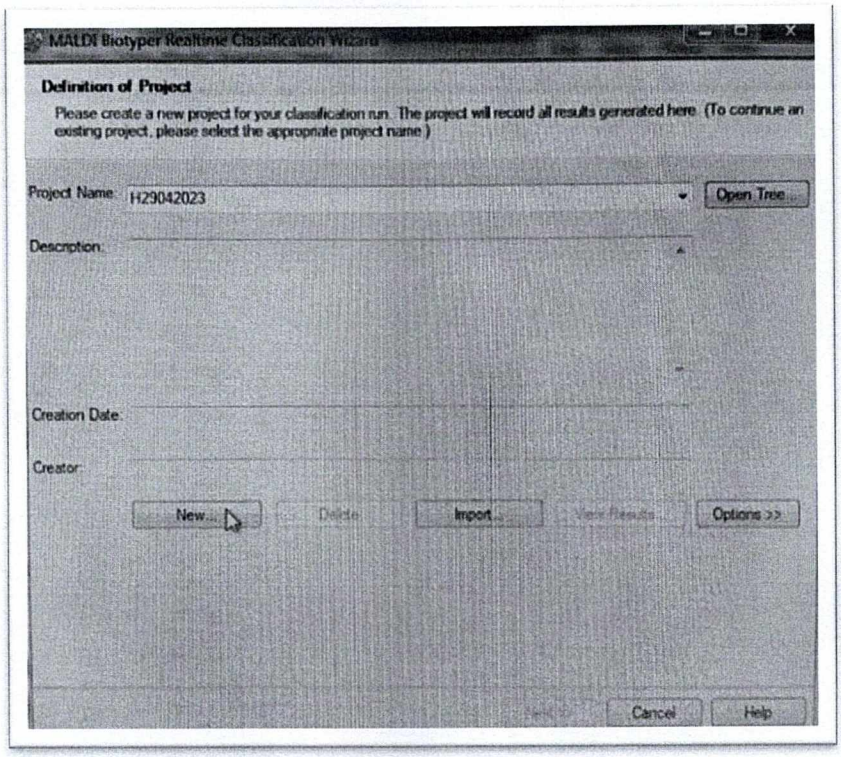
3.2.3.1 ในหน้าจอภาพ ใช้เมาส์คลิกไอคอน โปรแกรม MALDI Biotyper RTC (RTC 3.1)

จอภาพจะปรากฏรูปแผ่นงานที่ต้องการทดสอบ

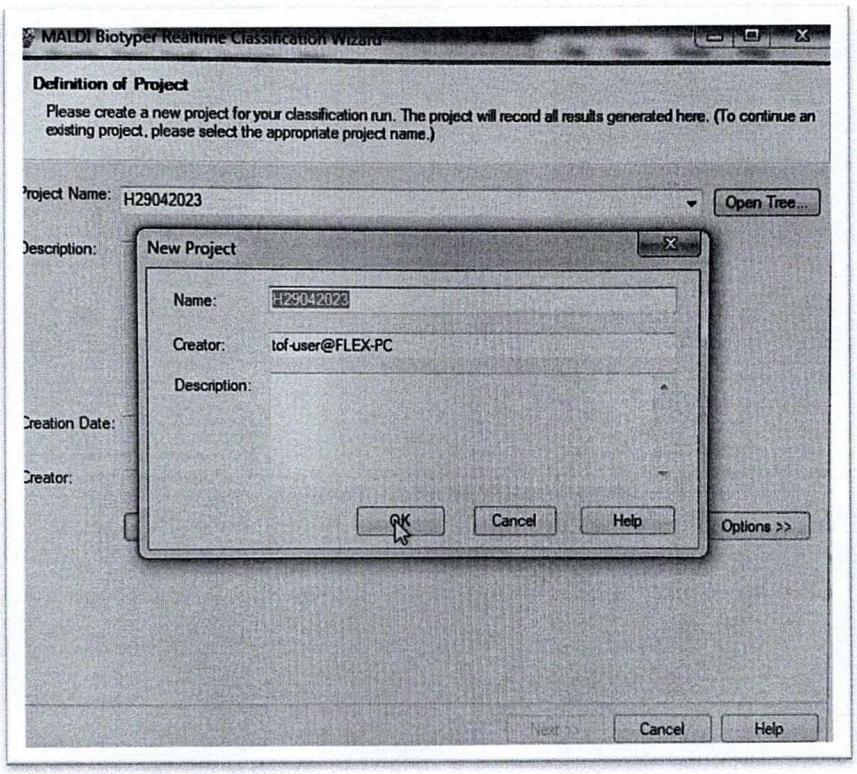
3.2.3.2 ใช้เมาส์คลิกที่ File ต่อด้วยคลิกเลือก New Classification (ภาพที่ 12) ภาพหน้าจอ Definition Project ปรากฏขึ้น (ภาพที่ 13) ให้ใส่ชื่องานที่ต้องการกำหนดในช่อง Project Name เช่น ในการทดสอบเชื้อจาก Hemo culture ใส่ตัวอักษร H ตามด้วยวันเดือนปี เช่น H29042023 เป็นต้น จากนั้นคลิกที่ปุ่ม New จะปรากฏหน้าจอ New Project ขึ้นมาให้ใส่ชื่องาน (Project) ในช่อง Name และใส่ชื่อผู้จัดทำ project ในช่อง Creator (ภาพที่ 14) เช่น Thidawan@FLEX-PC เป็นต้น แล้วกดปุ่ม OK



ภาพที่ 12 การสร้างแผ่นงานที่ต้องการทดสอบ (Project)

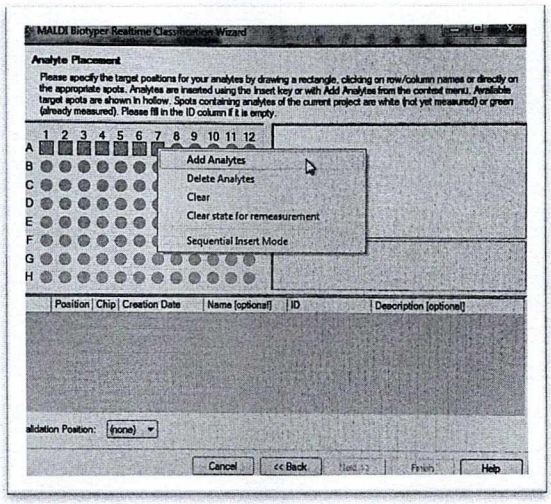


ภาพที่ 13 การใส่ชื่องานที่ต้องการทดสอบ (Project name)



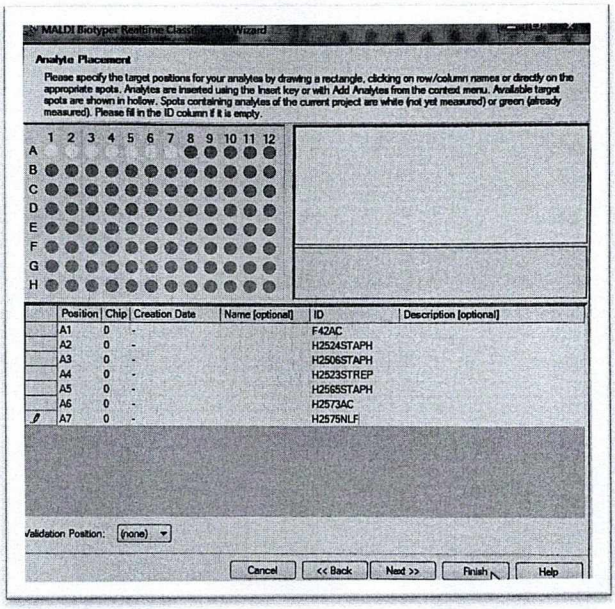
ภาพที่ 14 การใส่ชื่อผู้ทำการทดสอบ (Creator)

3.2.3.3 จอภาพจะปรากฏหน้ารายการ Analyte Placement (ภาพที่ 15) ใช้เมาส์คลิกเลือกตำแหน่งตัวอย่างบน Target ที่ต้องการวิเคราะห์โดยลากจากตำแหน่งแรกไปถึงตำแหน่งสุดท้ายที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ เช่น ต้องการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ตำแหน่ง A1–A7 เป็นต้น จากนั้นคลิกเมาส์ข้างขวา แล้วคลิกเลือก Add Analytes



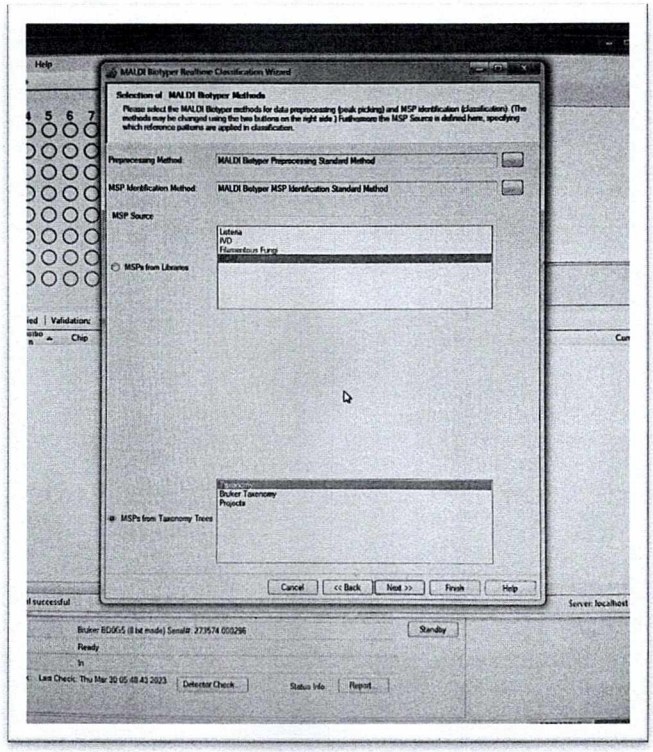
ภาพที่ 15 การเลือกตำแหน่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

3.2.3.4 จอภาพจะปรากฏรายการตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (A1-A7) ในช่องด้านล่างของจอภาพในรายการ Position/Chip/Creation Date/Name/ ID/Description (ภาพที่ 16) คลิกเมาส์ที่ตำแหน่ง ID และใส่ข้อมูลชื่อตัวอย่างในแถวของแต่ละตำแหน่งตัวอย่างเสร็จแล้วใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม Finish

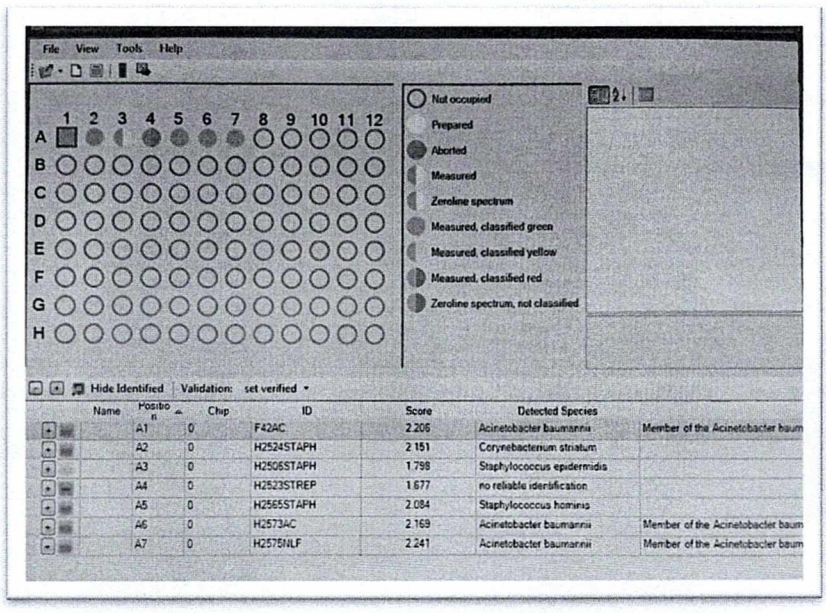


ภาพที่ 16 ผลการเลือกตัวอย่างและใส่ชื่อตัวอย่าง

3.2.3.5 เลือก method ที่จะใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method (ภาพที่ 17) จากนั้นคลิก Next หน้าสุดท้ายจะแสดงสรุปชื่อ method ที่ใช้ และจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ คลิก Finish เครื่องจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทันที เมื่อเครื่องทำการวิเคราะห์เสร็จสิ้นจะแสดงผลดังในภาพที่ 18

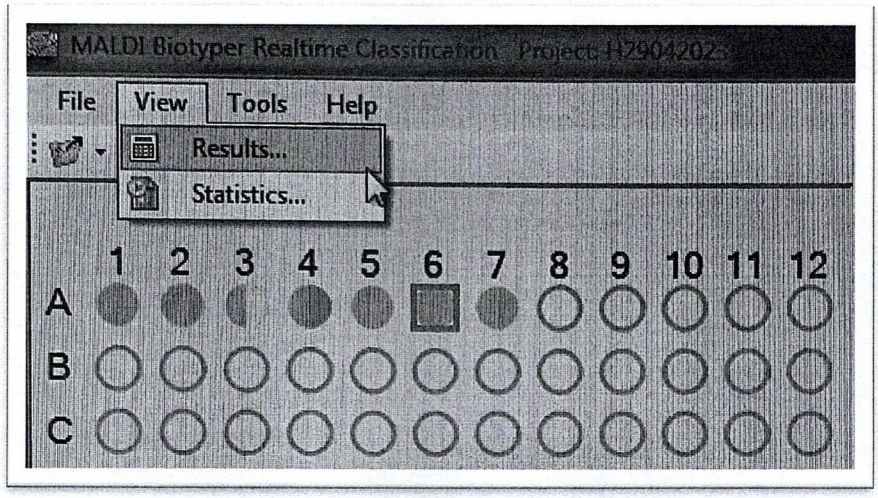


ภาพที่ 17 MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method

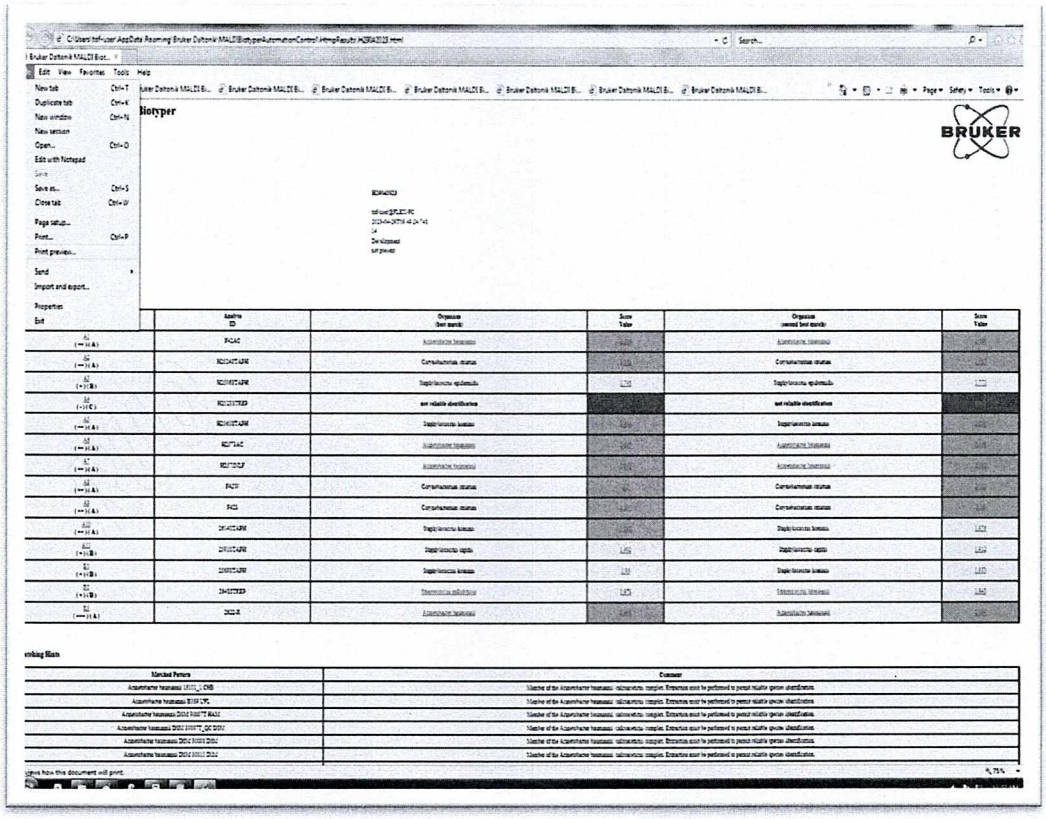


ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างตำแหน่ง A1-A7

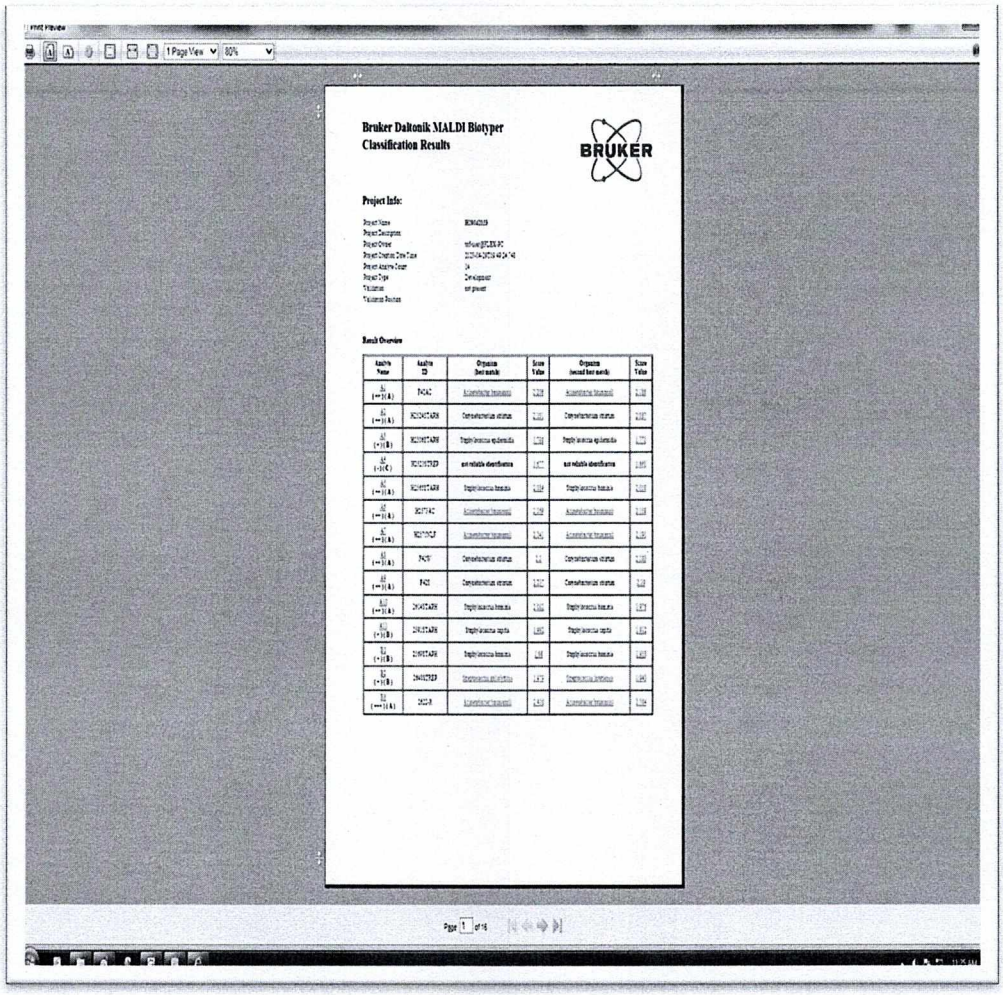
3.2.3.6 ในการพิมพ์ผลการวิเคราะห์ ใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม View จะปรากฏตัวเลือกขึ้น ใช้เมาส์คลิกที่ Results... ดังแสดงในภาพที่ 19 จอภาพจะแสดงใบรายงานผลวิเคราะห์ (ภาพที่ 20) แล้วใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม File และเลือกที่ตัวเลือก Print Preview ตรวจสอบ และสั่ง Print ต่อไป ใบรายงานผลที่สั่งพิมพ์ ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 19 คำสั่งแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง



ภาพที่ 20 ใบรายงานผลวิเคราะห์



ภาพที่ 21 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

3.2.4 การแปลผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เมื่อเครื่อง MALDI Biotyper วิเคราะห์ตัวอย่าง โดยการวัดค่า spectrum ด้วยโปรแกรม Software FlexControl 3.3 และประมวลผลด้วยโปรแกรม MALDI Biotyper 3.1 โดยนำค่า spectrum ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในคลัง (Library) แล้วแสดงผลออกมาเป็นคะแนน (Score) และสี (Color) มี 3 สี ซึ่งบ่งบอกระดับความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1) ผลคะแนนยิ่งสูงแสดงถึงผลการวิเคราะห์เชื้อจุลชีพมีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับเชื้อในคลังข้อมูล (Library) มากเท่านั้น

เมื่อได้ผลการวิเคราะห์แล้ว ให้บันทึกผลการวิเคราะห์ที่ได้ลงในแบบฟอร์มบันทึกผลการตรวจเพาะเชื้อ (เอกสารหมายเลข F-WI-MI 009/01)

ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์ออกมาว่า ไม่สามารถบ่งบอกชนิดของจุลชีพได้ หรือผลที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ ให้ทำการทดสอบโดยใช้อาหารทดสอบทางชีวเคมีควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ใหม่ด้วยเครื่อง MALDI Biotyper ด้วย

ตารางที่ 1 การแปลผลการวิเคราะห์ชนิดเชื้อจุลชีพด้วยเครื่อง MALDI Biotyper

Meaning of Score Values			
Range	Description	Symbols	Color
2.300-3.00	Highly probable species identification	(+++)	Green
2.00-2.299	Secure genus identification, probable species identification	(++)	Green
1.700-1.999	probable genus identification	(+)	Yellow
0.000-1.699	Not reliable identification	(-)	Red

สีเขียว ยอมรับได้ถึงระดับ Species ค่า Range Score 2.00-3.00

สีเหลือง ยอมรับได้ถึงระดับ Genus ค่า Range Score 1.700-1.999

สีแดง ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ด้วยเครื่อง MALDI หรือไม่มี Database ใน Library ค่า Range Score 0.00-1.699

ข้อพิจารณาผลการวิเคราะห์และการรายงานผล มีดังต่อไปนี้

3.2.4.1 ถ้า score ของ best match (เชื้อที่ได้คะแนนสูงสุดลำดับที่หนึ่ง) ได้มากกว่า 2.3 ขึ้นไปให้รายงานผลของ best match ได้เลย

3.2.4.2 ถ้า score ของ best match อยู่ระหว่าง 2.0-2.3 ให้ดูผลของ match ที่ 2 (เชื้อที่ได้คะแนนลำดับที่สอง) และ 3 (เชื้อที่ได้คะแนนลำดับที่สาม) ว่าได้ species ตรงกับ best match หรือไม่ถ้าตรงกันให้รายงานผล species ของ best match นั้นได้เลย

3.2.4.3 จากข้อ 3.2.4.2 ถ้า species ของ match ที่ 2 และ 3 ไม่ตรงกับ match แรกให้เตรียมตัวอย่างแบบ Direct smear ใหม่

3.2.4.4 กรณีที่ได้ score 1.7-1.99 สามารถวิเคราะห์ได้ว่า

(1) สเมียร์เชื้อหนาเกินไป ต้องทำการ smear เชื้อใหม่

(2) HCCA Matrix ที่นำมาใช้งานนั้นมีความเข้มข้นไม่ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีการตกผลึกอยู่ที่ก้นหลอด ให้เตรียมสารละลายใหม่ หรือทำการเขย่า (Mixer) ก่อนใช้งานทุกครั้ง

(3) เชื้อมีเมือก (Capsule) ปกคลุมอยู่มาก แนะนำให้ใช้วิธี Formic acid extraction ในการเตรียมตัวอย่าง

3.2.4.5 กรณีที่ได้ Score ต่ำกว่า 1.7 เครื่องจะแสดงผลว่า Not reliable identification ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ ต่อไปนี้

(1) วิธีการ Direct smear ไม่เหมาะสมกับเชื้อนี้ ให้ใช้วิธี Formic acid extraction

(2) ไม่มีเชื้อนี้อยู่ใน Library ให้ทำการเพิ่มเติมเชื้อนี้เข้าไป

3.2.4.6 กรณีที่แสดงผลเป็นสีแดงและ No peak found (ไม่ปรากฏสเปกตรัม) ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ ต่อไปนี้

(1) ไม่ได้หยด HCCA หรือ มีความเข้มข้นไม่ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เตรียม HCCA ใหม่

(2) สเมียร์เชื้อหนาเกินไป

(3) วิธีการ Direct smear ไม่เหมาะสมกับเชื้อนี้ ให้ใช้วิธี Formic acid extraction

3.2.5 การสอบเทียบ (Calibration)

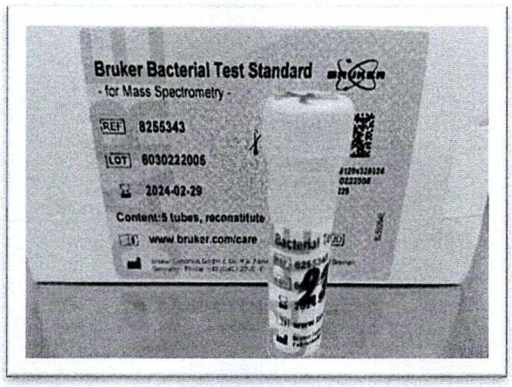
การสอบเทียบเป็นการทดสอบด้วยเชื้อมาตรฐาน Bruker Bacterial Test Standard (BTS) (ภาพที่ 22) สกัดมาจาก *Escherichia coli* DH5 alpha เพื่อดูว่าเครื่องสามารถใช้งานได้ปกติ การวิเคราะห์และแปลผลให้ค่าถูกต้อง ตามคู่มือของผลิตภัณฑ์แนะนำให้ทำทุกครั้งก่อนการใช้งานประจำวัน ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มีการใช้งานเป็นประจำทุกวัน จึงได้กำหนดให้มีการทำเป็นประจำทุกสัปดาห์หรืออย่างน้อยเดือนละครั้ง สามารถทำได้สองวิธีคือแบบเต็มและแบบย่อ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.5.1 การสอบเทียบแบบเต็ม มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

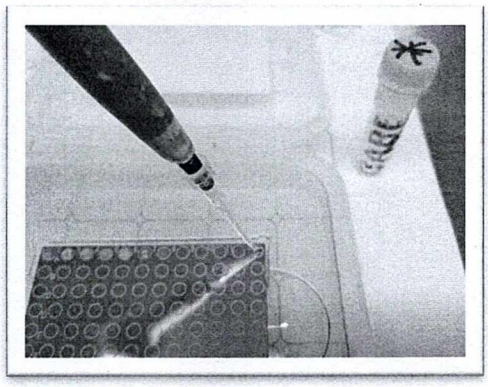
(1) ใช้เมาส์คลิกไอคอนโปรแกรม FlexControl

บนหน้าจอเพื่อเปิดโปรแกรมขึ้นใช้งาน

(2) หยดสารมาตรฐาน BTS ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในหลุมตำแหน่ง A12 บนฐานรับตัวอย่าง (MALDI Target Plate) ซึ่งเป็นตำแหน่งสำหรับทำการทดสอบ BTS ดังแสดงในภาพที่ 23 ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลาย HCCA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

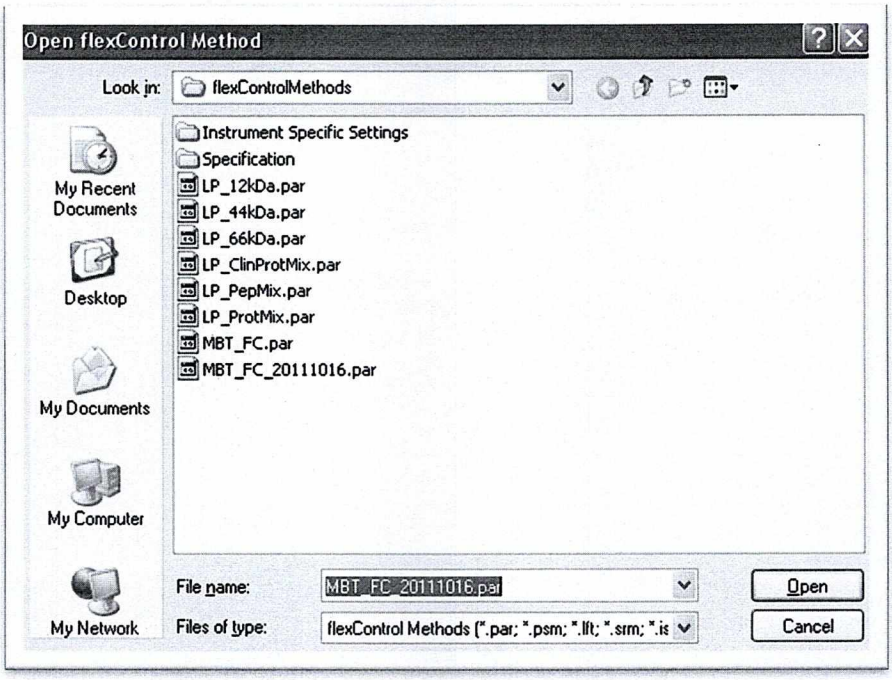


ภาพที่ 22 สารละลาย BTS (Bruker Bacterial Test Standard)



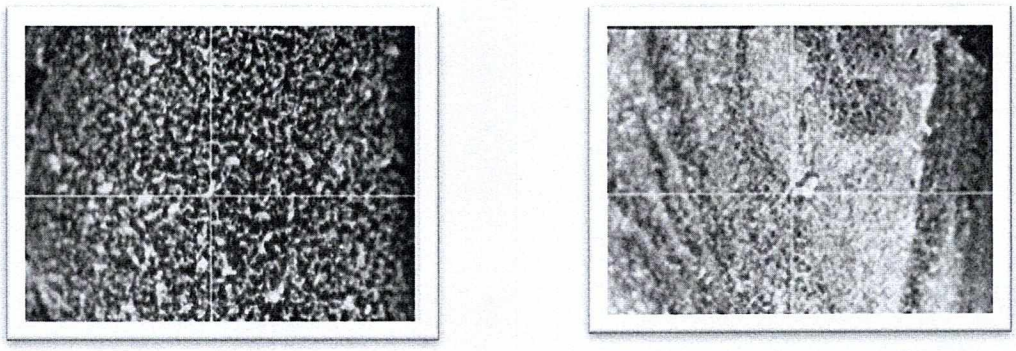
ภาพที่ 23 ตำแหน่ง A12 บนแผ่น MALDI Target Plate สำหรับทดสอบ BTS

(3) ใช้เมาส์คลิกปุ่ม File แล้วคลิกเลือก FlexControl Methods จะเห็นไฟล์ต่างๆ ให้คลิกเลือกไฟล์ “MBT_FC.par” ดังแสดงในภาพที่ 24



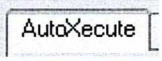
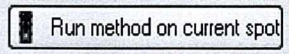
ภาพที่ 24 การเปิดไฟล์ “MBT_FC.par” เพื่อใช้งาน

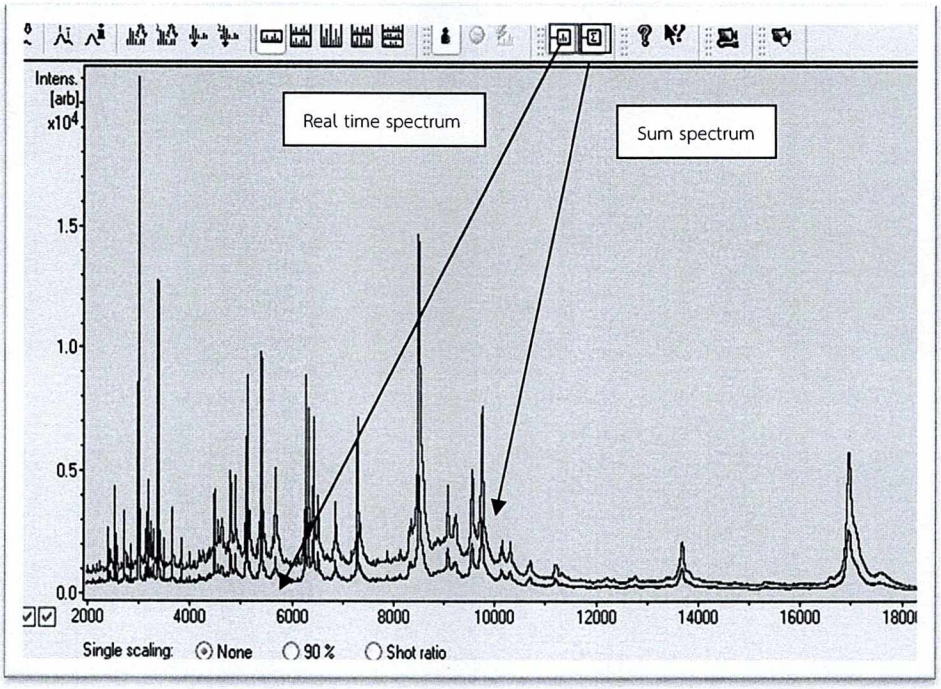
(4) เมื่อเลื่อนฐานรองรับตัวอย่างเข้าไปในเครื่องแล้ว ทางด้านซ้ายของจอภาพจะแสดงภาพผลึกของตัวอย่าง (หรือเรียกว่า Target) ลักษณะผลึกของตัวอย่างที่ดีและไม่ดี (หนาเกินไป) (ภาพที่ 25)



(ก) ผลึกที่ดี มีความบางสม่ำเสมอ (ข) ผลึกไม่ดี มีความหนาเกินไป

ภาพที่ 25 ลักษณะผลึกของสารตัวอย่าง

(5) ใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม AutoXecute  และต่อด้วยคลิกที่ปุ่ม Run method on current spot  จอจะแสดงภาพกราฟ Spectrum ขณะเครื่องทำการวิเคราะห์ เมื่อการวิเคราะห์เสร็จแล้ว ให้คลิกปุ่ม เท่านั้น เพื่อแสดงภาพผลรวมของ Spectrum ดังแสดงในภาพที่ 26

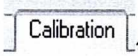


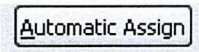
ภาพที่ 26 Real time spectrum และ Sum spectrum

หมายเหตุ : Sum spectrum คือ spectrum ที่ได้จากการรวม Laser shot ที่ดีทุก ๆ 40 Laser shots จนครบ 240 Laser shots เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

: Real time spectrum คือ spectrum ที่ได้ขณะวิเคราะห์

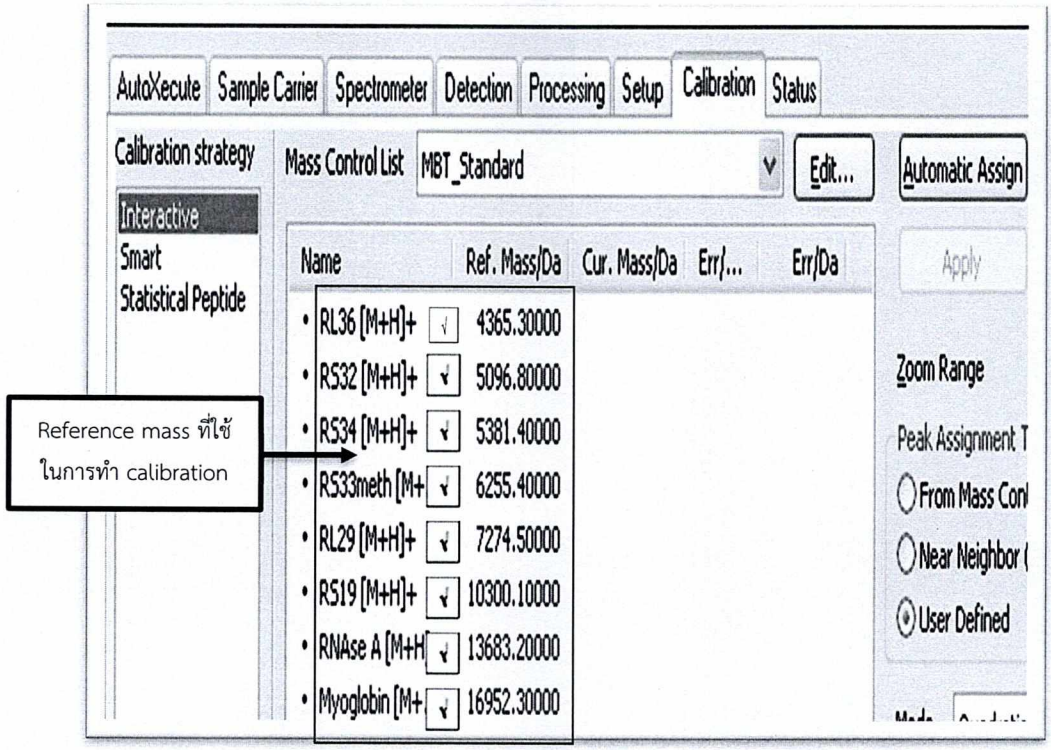
(6) ใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม เพื่อทำ smooth spectrum in sum spectra

(7) ใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม  จะปรากฏที่จอ

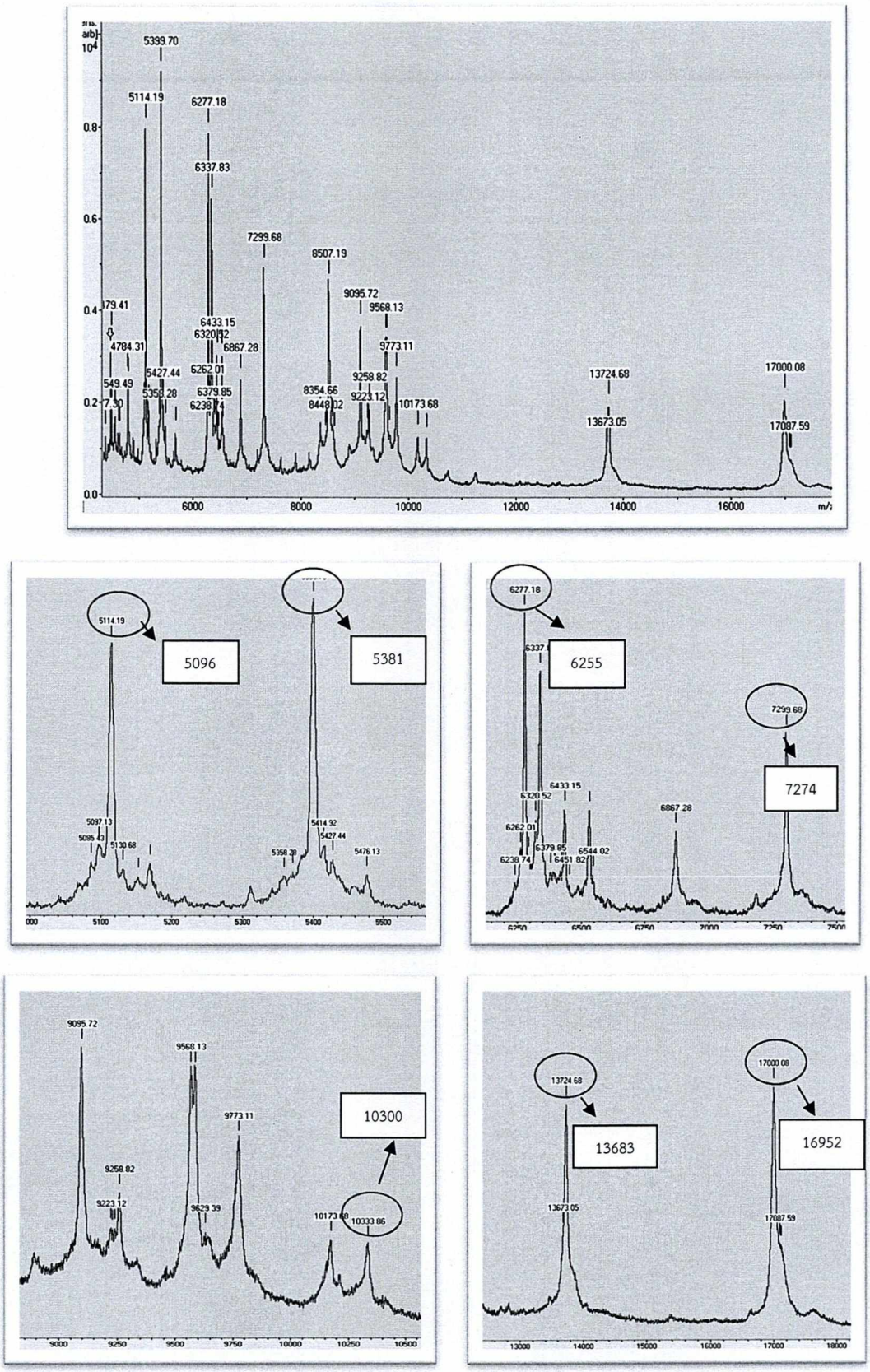
(8) ใช้เมาส์คลิกที่ปุ่ม Automatic Assign  เพื่อให้เครื่องดำเนินการสอบเทียบ

เมื่อเครื่องทำการสอบเทียบ (Calibration) เสร็จจะพบว่ามีเครื่องหมายถูก (√) หน้า reference mass แต่ละ mass ดังแสดงในภาพที่ 27 ถ้ามีเครื่องหมายถูกไม่ครบทุก mass ให้ zoom ไปที่ mass เหล่านั้นบนหน้าจอ เอา cursor ไปชี้ที่ตำแหน่งของ mass เหล่านั้นแล้วคลิกซ้าย 1 ครั้งที่กึ่งกลางของ peak เครื่องก็จะ detect mass นั้น ถ้า FlexControl เห็นว่า peak เหมาะสมและตรงกับ mass ใน calibration table เส้นสีแดงในแนวตั้งจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว และค่า m/z ปัจจุบันของ peak จะถูก copy มาใน calibration table ลักษณะ spectrum รวม และ spectrum ของแต่ละ reference mass แสดงดังภาพที่ 28

เมื่อ calibrate ครบทุก mass แล้ว ให้คลิก จำนวน mass ที่ถูกเลือกอย่างต่ำต้องใช้ 5 mass ถ้ามีจำนวนไม่ถึง ให้เตรียมสารละลายมาตรฐาน BTS ใหม่

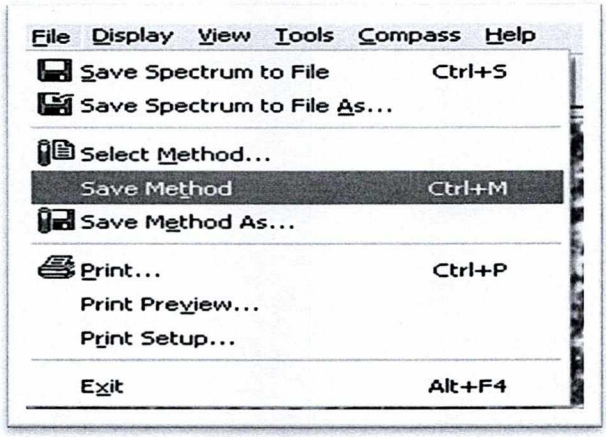


ภาพที่ 27 Reference mass ที่ใช้ในการทำสอบเทียบ (Calibration)



ภาพที่ 28 ลักษณะ spectrum รวม และ spectrum ของแต่ละ reference mass

(9) ใช้เมาส์คลิกปุ่ม File แล้วคลิกเลือกคำสั่ง Save Method เพื่อบันทึกผล (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การบันทึกผลการสอบเทียบ (Calibration)

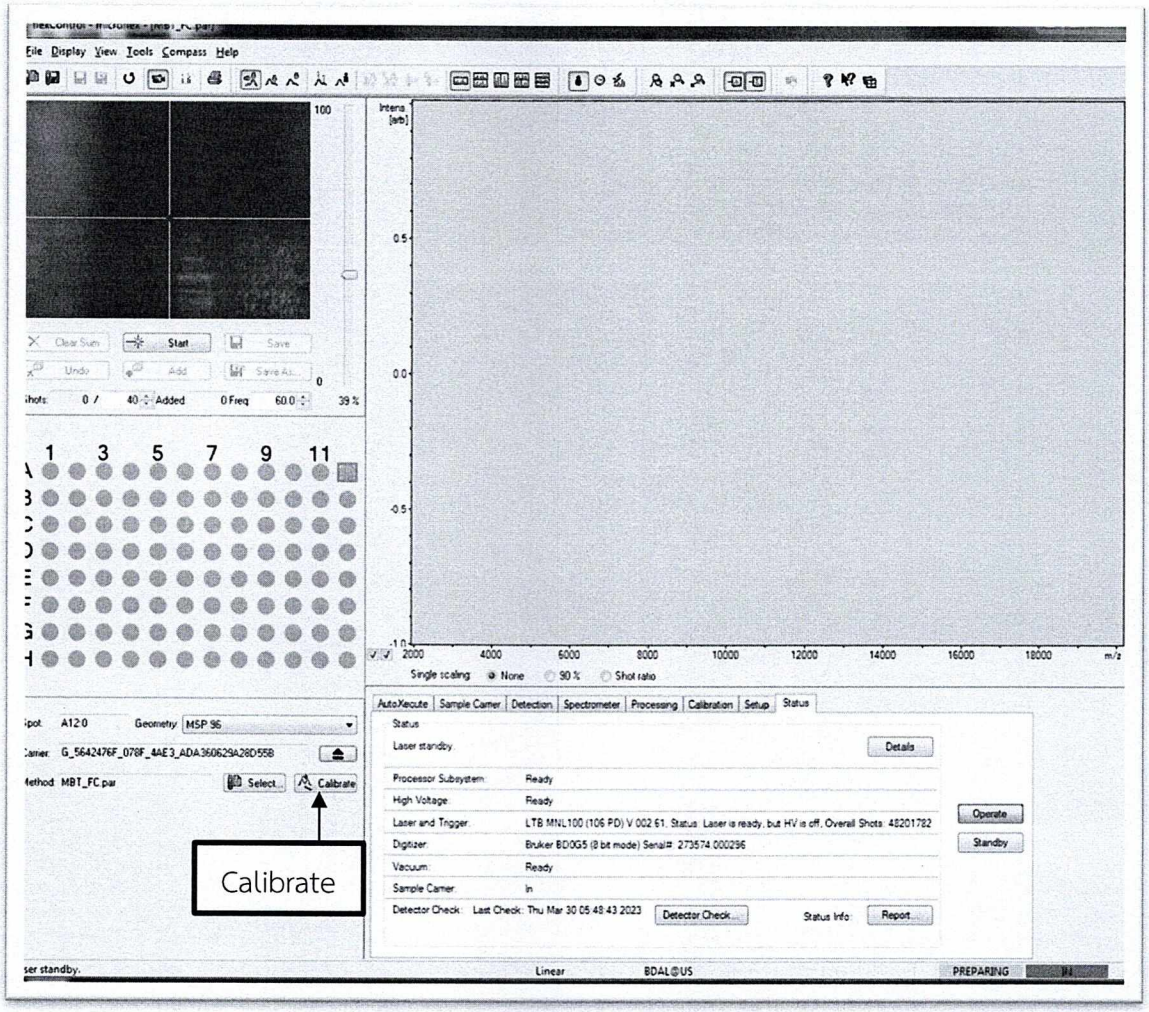
3.2.5.2 การสอบเทียบแบบย่อ

การสอบเทียบแบบย่อ ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาตามปกติเมื่อเครื่องวิเคราะห์ MALDI Biotyper ได้รับการตั้งค่าเรียบร้อยแล้วในครั้งแรก มีขั้นตอนดังนี้

(1) ใช้เมาส์คลิกไอคอนโปรแกรม FlexControl บนหน้าจอ เพื่อเปิดโปรแกรมขึ้นใช้งาน

(2) หยดสารมาตรฐาน BTS ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในหลุมตำแหน่ง A12 บนฐานรับตัวอย่าง (MALDI Target Plate) ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วหยดสารละลาย HCCA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำ MALDI Target Plate ที่เตรียมไว้ใส่ไปในเครื่อง

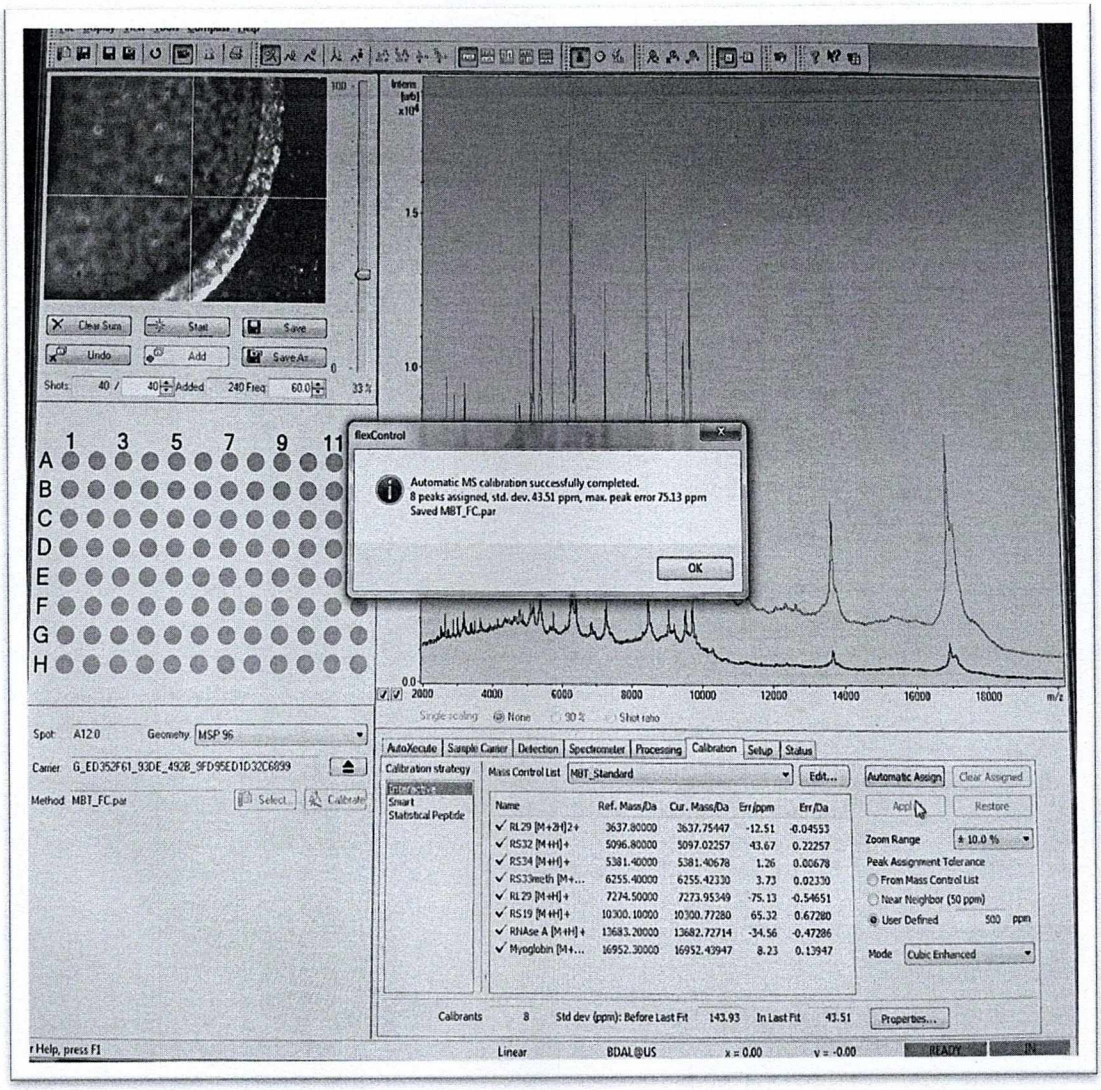
(3) เมื่อเครื่องอยู่ในสถานะ Ready ให้กดปุ่ม Calibrate ที่ปรากฏบนหน้าจอ ดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ตำแหน่ง A12 ที่ใช้ทำการสอบเทียบและ
ปุ่ม Calibrate สำหรับทำการสอบเทียบแบบย่อ

(4) เมื่อเครื่องทำการสอบเทียบเสร็จและพบว่ามีเครื่องหมายถูกหน้า reference mass แต่ละ mass ครบทุกตำแหน่งและแสดงข้อความ “Automatic MS calibration successfully completed. 8 peaks assigned, std. dev..... ppm, max. peak error.....ppm. Saved MBT_FC.par” เรียบร้อยแล้ว (ภาพที่ 31) จึงจะสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นลำดับต่อไปได้

(5) ผลการควบคุมคุณภาพเครื่อง MALDI Biotyper ให้บันทึกผลการควบคุมคุณภาพเครื่อง MALDI Biotyper ลงในบันทึกการติดตามควบคุมคุณภาพการวินิจฉัยชนิดของเชื้อและความไวยา หมายเลขเอกสาร F-WI-MI-004/02 และแบบฟอร์ม QC MALDI Biotyper หมายเลขเอกสาร F-WI-MI-004/04



ภาพที่ 31 ผลการสอบเทียบ (Calibration)

3.2.6 การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์จุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper

การควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์จุลชีพโดยเครื่อง MALD Biotyper ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา แบ่งเป็น 2 รูปแบบ ดังนี้

3.2.6.1 การควบคุมคุณภาพภายใน มีกระบวนการในการปฏิบัติ 3 ประการ ได้แก่

(1) การควบคุมคุณภาพเครื่อง MALDI Biotyper รุ่น Microflex ตามคำแนะนำของคู่มือผลิตภัณฑ์ ให้ทำการทดสอบด้วย Bruker Bacterial test Standard (BTS) และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 9 สายพันธุ์ ได้แก่

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25913
4. *Escherichia coli* ATCC 25922
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
6. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
7. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
8. *Enterococcus faecalis* ATCC 51299
9. *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 แล

หมายเหตุ : การใช้เครื่อง MALDI-TOF MS ในการวิเคราะห์ผลใช้ Bacterial Test Standard (BTS) ซึ่งสกัดมาจากเชื้อ *Escherichia coli* DH5alpha ซึ่งครอบคลุม peak ของโปรตีนและเปปไทด์ในช่วง 4-17 kDa เป็นตัว calibrator ค่า Error ต้องอยู่ในช่วง ±300 ppm

(2) ขั้นตอนการควบคุมคุณภาพเครื่อง MALDI Biotyper ทำการควบคุมคุณภาพของการระบุชนิดของเชื้อเดือนละครั้ง โดยทำการทดสอบกับเชื้อจุลชีพสายพันธุ์มาตรฐานตามข้อกำหนดของเครื่องมือ และผลของการทดสอบจะต้องถูกต้องทั้งหมดจึงจะยอมรับได้

(3) การทำ Internal Quality Control (IQC) และ unknown specimens เพื่อควบคุมคุณภาพของบุคลากรในการทดสอบการเพาะเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อ โดยผู้ปฏิบัติงานจะต้องผ่านการประเมินความสามารถตามเกณฑ์วิธีการประเมินบุคลากรผู้ปฏิบัติงานจุลชีววิทยาในคู่มือเรื่อง การประเมินความสามารถบุคลากร หมายเลขเอกสาร M-LAB-03 เป็นเอกสาร ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

(4) การประเมินผลการควบคุมคุณภาพภายใน ปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติงานเรื่อง การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของผู้ปฏิบัติงาน หมายเลขเอกสาร WI-MI-028 และเก็บข้อมูลไว้ในแฟ้มแบบประเมินคุณภาพภายในของเจ้าหน้าที่งานจุลชีววิทยา หมายเลขเอกสาร SD-MI-004

3.2.6.2 การควบคุมคุณภาพภายนอก

งานจุลชีววิทยาเข้าร่วมเป็นสมาชิกการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์กับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยทำการทดสอบปีละ 3 ครั้ง การประเมินผลการควบคุมคุณภาพภายนอก ปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติงานเรื่อง การประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์โดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment; EQA) หมายเลขเอกสาร WI-MI-016 และเก็บข้อมูลไว้ในแฟ้ม External Quality Control (EQC) หมายเลขเอกสาร SD-MI-003

3.3 การบำรุงรักษาเครื่อง MALDI Biotyper

การบำรุงรักษาเครื่อง MALDI Biotyper แบ่งออกเป็น การบำรุงรักษาเครื่องเป็นประจำทุกวัน ทุกเดือนและการบำรุงรักษาเครื่องประจำปี รายละเอียดมีดังนี้

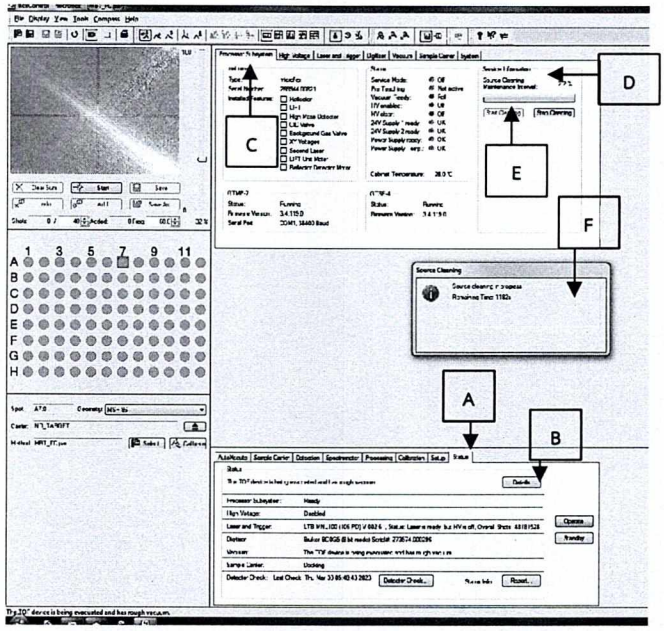
3.3.1 การบำรุงรักษาประจำวัน ผู้ใช้งานต้องปฏิบัติการบำรุงรักษาเครื่อง MALDI Biotyper เป็นประจำทุกวัน และบันทึกผลในแบบฟอร์มบันทึกการบำรุงรักษาเครื่อง ในเอกสารหมายเลข F-LAB-042 รายการบำรุงรักษาเครื่อง มีดังนี้

3.3.1.1 การรักษาความสะอาดของช่อง Target พยายามอย่าให้มีฝุ่นละออง หรือเศษต่าง ๆ ตกลงไป ให้ใช้กระดาษเช็ดไร้ฝุ่นขุย (Kimwipes) เช็ดทำความสะอาดทุกครั้งหลังการใช้งาน

3.3.1.2 การทำความสะอาด Target ที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างเชื้อ ให้ทำความสะอาดด้วย 70% alcohol และล้างด้วยน้ำสะอาด เช็ดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดไร้ฝุ่นขุย

3.3.1.3 การดูและรักษาภายนอกตัวเครื่องให้ทำความสะอาดอยู่เป็นประจำทุกวัน

3.3.2 การบำรุงรักษาประจำเดือน เป็นการทำความสะอาดแหล่งกำเนิดแสง (Laser Source) ใช้โปรแกรม Source cleaning (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การทำความสะอาดแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ (Laser source cleaning) การทำงานเริ่มจากกดปุ่ม Status (A) ตามด้วยปุ่ม Details (B) เลือก Processor Subsystem (C) หน้าจอจะแสดง Service Information Source Cleaning Maintenance Interval (%) การใช้งาน (D) ให้กดปุ่ม Start cleaning (E) เครื่องจะเลื่อน Stage ออกมาให้อยู่ในสถานะ Out และแสดงสถานะ Source cleaning in progress, Remaining times (F) หน้าจอแสดงระยะเวลาที่คงเหลือในการทำความสะอาดเป็นวินาที (ใช้เวลา 20 นาที) ในระหว่างการทำงาน Stage จะเลื่อนกลับเข้าไปในตัวเครื่องและอยู่ในสถานะ In โดยอัตโนมัติ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหน้าจอจะแสดง 0.0% สามารถใช้งานเครื่องได้ตามปกติ

3.3.3 การบำรุงรักษาประจำปี

ดำเนินการโดยช่างเทคนิคที่ชำนาญการของบริษัทและเป็นพนักงานประจำของบริษัท โดยผ่านการฝึกอบรมจากบริษัทผู้ผลิตเท่านั้น เนื่องจากเป็นเครื่องมือพิเศษและมีมูลค่าค่อนข้างสูง โดยจะต้องใช้เวลาและกระบวนการทำงานที่ละเอียดและซับซ้อนนานหลายชั่วโมง จำเป็นต้องมีการวางแผนการทำงาน งดใช้เครื่องในช่วงเวลาดังกล่าว

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้กำหนดและทำการจัดจ้างซ่อมบำรุงรักษาเป็นรายปีงบประมาณ แบ่งการดำเนินงานเป็น 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งมีการตรวจสอบและบำรุงรักษาดังนี้

3.3.2.1 ทำความสะอาด Ion-Source

3.3.2.2 เปลี่ยนชุด O-ring ภายในเครื่อง

3.3.2.3 เปลี่ยนตัวกรองอากาศด้านหลังเครื่องจำนวน 1 ชุด

3.3.2.4 ตรวจสอบการทำงานของระบบ Vacuum

3.3.2.5 ตรวจสอบการทำงานของระบบ High Voltage Power Supply

3.3.2.6 ตรวจสอบการทำงานของระบบ X-Y Movement

3.3.2.7 ตรวจสอบการทำงานของระบบ Ion Optic

3.3.2.8 ตรวจสอบการทำงานของ Detector

3.3.2.9 ตรวจสอบ Spectrum Linear mode

3.4. ข้อควรระวังในการใช้งานเครื่อง MALDI Biotyper

3.4.1 รักษาระดับอุณหภูมิห้องปฏิบัติการและความชื้นของห้องที่ติดตั้งเครื่องให้เหมาะสม เนื่องจากเครื่องมือมีการระบายความร้อน เพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายต่ออุปกรณ์ภายในตัวเครื่องและระบบสุญญากาศ

3.4.2 รักษาความสะอาดภายในห้องปฏิบัติการให้ปราศจากฝุ่นละออง เนื่องจากเครื่องมือนี้มีความไวต่อฝุ่นละออง โดยเฉพาะบริเวณ Oring

3.4.3 หลังการใช้งานทุกครั้งให้ Target อยู่ ในสถานะ In เท่านั้น เนื่องจากจะมีผลต่อระบบ Vacuum จะไม่สามารถรักษาระดับความดันได้ เครื่องจะทำการตัดระบบสุญญากาศภายในและทำให้เครื่องเกิดสภาวะนิ่ง (Vacuum fail) ต้องทำการเปิด-ปิด เครื่องใหม่ ทำให้ใช้เวลาในการดำเนินงานเพิ่มมากขึ้น

3.4.4 ระมัดระวังการปนเปื้อนของเชื้อที่นำมาทำการทดสอบในแต่ละหลุม ซึ่งอาจมีผลต่อผลการตรวจวิเคราะห์ กรณีที่ผลไม่อยู่ในช่วงการทดสอบ แนะนำให้ทำความสะอาดเครื่องและแก้ไขเบื้องต้น ถ้าแก้ไม่ได้ให้ติดต่อช่างประจำเครื่องมาตรวจสอบเครื่อง เพื่อหาสาเหตุที่ทำให้ผลไม่อยู่ในช่วงการทดสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง

3.4.5 น้ำยาและสารเคมี ควรเก็บรักษาให้ถูกต้อง ในสถานที่และอุณหภูมิที่เหมาะสมตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

บทที่ 4
ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper เป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง องค์ประกอบของเครื่องและระบบปฏิบัติการมีความซับซ้อน และผู้ใช้งานเครื่องนี้ต้องได้รับการอบรมให้มีทักษะและประสบการณ์ในการใช้งานเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามในการปฏิบัติงานการใช้เครื่องดังกล่าวอาจเกิดปัญหาและอุปสรรคต่าง ๆ แบ่งเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ปัญหา อุปสรรคทางเทคนิค และปัญหาอุปสรรคของตัวเครื่องและระบบปฏิบัติการ ซึ่งปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข มีรายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

ปัญหา	อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
ปัญหาและอุปสรรคทางเทคนิค		
1) ผู้ใช้งานขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้งานเครื่อง	- เครื่องเกิดการใช้งานขัดข้อง	- จัดให้มีการอบรมวิธีการใช้งานเครื่องแก่เจ้าหน้าที่ทุกคนก่อนการใช้งานครั้งแรกและมีการทบทวนความรู้ทั้งภาคทฤษฎีและปฏิบัติเป็นประจำทุกปี จากเจ้าหน้าที่ผู้เชี่ยวชาญของผลิตภัณฑ์
2) ปัญหาจากตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ - เชื้อมีผนังเซลล์หนาและเชื้อมีเมือก (Capsule) มาก	- ไม่แสดงสเปกตรัม (No peak) หรือให้ค่าความน่าเชื่อถือ (Score) ในระดับต่ำ	- แนะนำให้ใช้วิธี Extended Direct Transfer Technique แทน วิธี Direct Transfer Technique โดยใช้ 70% Formic acid ช่วยในการเตรียมตัวอย่าง
- สเมียร์เชื้อหนาเกินไปและไม่สม่ำเสมอทำให้เมทริกซ์ไม่สามารถจับกับสารตัวอย่างได้สมบูรณ์		- สเมียร์เชื้อให้บาง สม่ำเสมอเต็มพื้นที่หลุมทดสอบ
- เชื้อที่นำมาทดสอบยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่หรือไม่มีความบริสุทธ์		- ใช้เชื้อที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่อย่างน้อย 18-24 ชั่วโมงและเลือกโคโลนีที่มีความบริสุทธิ์ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ (Isolation)

ตารางที่ 2 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข (ต่อ)

ปัญหา	อุปสรรค	แนวทางแก้ไข
ปัญหาและอุปสรรคทางเทคนิค		
3) HCCA Matrix และ BTS 3.1) ความเข้มข้นไม่ได้ตามที่กำหนด 3.2) การเก็บรักษาไม่ถูกวิธี	- ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง - น้ำยาไม่ได้คุณภาพ	- ตรวจสอบปริมาตรของสารละลาย TFA ที่เตรียมให้ถูกต้องและผสม (Vortex) สารให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนการใช้งานทุกครั้ง - เก็บรักษาน้ำยาและสารเคมีในสถานที่และอุณหภูมิที่เหมาะสมตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ - BTS เก็บรักษา ที่อุณหภูมิ -20°ซ. - HCCA Matrix Stock เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ. - HCCA Matrix ที่เตรียมเป็นสารละลายพร้อมใช้งานให้เก็บในกล่องมิดชิดพ้นจากแสงที่อุณหภูมิห้อง
4) วิเคราะห์ผลไม่ถูกต้อง	- รายงานผลคลาดเคลื่อนหรือผิดพลาด	- ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องวิเคราะห์ผลที่ได้จากเครื่องมือร่วมกับลักษณะของเชื้อที่นำมาทดสอบจำเป็นต้องอาศัยทักษะและประสบการณ์ในการทำงาน รวมถึงสามารถขอคำปรึกษาจากเพื่อนร่วมงานที่มีประสบการณ์ได้

ตารางที่ 2 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

ปัญหาและอุปสรรคจากตัวเครื่องและระบบปฏิบัติการ		
1) Vacuum failed เกิดจาก - ฐานเครื่อง (Stage) ไม่ได้อยู่ในตัวเครื่อง - มีคราบหรือเศษฝุ่นละอองบริเวณฐานและ Oring รวมถึงตัว Target ที่ใช้งาน	- เครื่องไม่อยู่ในสถานะพร้อมใช้งาน (Ready)	- ตรวจสอบให้แน่ใจว่า Stage อยู่ในสถานะ In เสมอทุกครั้งหลังการใช้งาน - เช็ดทำความสะอาดด้วยกระดาษชนิดที่ปราศจากเส้นใย บริเวณฐานและ Oring รวมถึง Target เป็นประจำทุกวัน
2) ระบบปฏิบัติการประมวลผลล่าช้าหรือใช้เวลานานกว่าปกติใช้งานปริมาณมากจากมีการยิงเลเซอร์จำนวนมาก	- รายงานผลล่าช้า	- ทำความสะอาด Laser ด้วยโปรแกรม Source Cleansing อยู่เป็นประจำทุกเดือนหรือสังเกตเมื่อเครื่องมีการประมวลผลที่ล่าช้ากว่าปกติ
3) คุณภาพและจำนวนของ Database ใน Library ของเครื่อง (ระบบปฏิบัติการ) ไม่เพียงพอ	- ไม่สามารถรายงานผลวิเคราะห์ได้ถึงระดับจีนัสหรือสปีชี่ส์ ในเชื้อบางสายพันธุ์	- กรณีที่ไม่สามารถรายงานผลได้ในระดับจีนัส จำเป็นต้องปรึกษาเพื่อนร่วมงานผู้มีประสบการณ์ อาจารย์ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกและแพทย์ผู้ทำการรักษา - รายงานผลชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับจีนัส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับข้อตกลงระหว่างห้องปฏิบัติการและแพทย์หน่วยควบคุมโรคติดเชื้อของโรงพยาบาลและแพทย์ผู้ทำการรักษาในการยอมรับผลที่ได้ เพียงพอในการนำไปวินิจฉัยโรค - การปรับปรุงหรือเพิ่มฐานข้อมูลมีข้อจำกัดเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายในการซื้อระบบปฏิบัติการค่อนข้างสูง

หมายเหตุ : ตัวอย่างเชื้อที่มีความใกล้เคียงกันของสเปกตรัม

1. *Acinetobacter baumannii* – calcoaceticus complex ได้แก่ *A. baumannii A. pittii* และ *A. nosocomialis*

2. *Shigella* spp. ต่าง ๆ กับ *Escherichia coli*

3. *Streptococcus pneumonia* และ *Streptococcus mitis* group

4. *Stenotrophomonas maltophilioa* กับ *Pseudomona* species (Ps. *Hibiscola*, *Ps. Genicไมโครลิตรata* และ *Ps. Beteli*

5. *Enterobacter cloacae* complex ประกอบด้วย *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* และ Enterobacter nimipressuralis

6. *Pseudomonas puitda* group

7. *Bordetella pertussis* และ *Bordetella bronchiseptica*

8. *Achromobacter xylosoxidans* และ *Achromobacter ruhlandii*

9. *Pseudomonas fluorescens* group

10. *Burkholderia cepacia* complex

11. *Bacteroides nordii* และ *Bacteroides salyersiae*

12. *Listeria species*

13. *Candida africana* พิจารณาอยู่ในกลุ่ม *Candida albicans*

14. *Aeromonas* group

15. *Klebsiella oxytoca* กับ *Raoutella ornitholytica*

บทที่ 5
ข้อเสนอแนะ

คู่มือการปฏิบัติงานเรื่อง วิธีการใช้งานเครื่องวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ โดยเครื่อง MALDI Biotyper ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Microflex ฉบับนี้ ผู้จัดทำได้รวบรวมเนื้อหาหลักการและวิธีการปฏิบัติงานต่าง ๆ โดยอ้างอิงจากเอกสารประกอบการใช้งานเครื่อง ความรู้ทั้งภาคทฤษฎีและปฏิบัติที่ได้รับการถ่ายทอดจากผู้เชี่ยวชาญของผลิตภัณฑ์ ตลอดจนอาศัยประสบการณ์ในการทำงานและใช้งานเครื่องมือมาตลอดระยะเวลาหลายปี เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องมีแนวทางปฏิบัติที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน มีความรู้ความเข้าใจในหลักการทำงานของเครื่องมือและระบบปฏิบัติการ การใช้งานและวิธีการดูแลรักษา ทราบถึงปัญหาและอุปสรรคด้านต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้น สามารถค้นหาสาเหตุรวมถึงมีแนวทางในการแก้ไขปัญหานั้น ๆ ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม เครื่องมือซึ่งเป็นเครื่องมือหลักในการปฏิบัติงานและทำการตรวจวิเคราะห์ เมื่ออยู่ในสภาพพร้อมใช้งานและเพื่อให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ ย่อมนำไปสู่การรายงานผลที่ถูกต้องและรวดเร็ว ทำให้ผู้รับบริการโดยเฉพาะแพทย์ที่ต้องนำผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลชีพไปใช้ในการวินิจฉัยโรคและให้การรักษาแก่ผู้ป่วยด้วยยาปฏิชีวนะได้อย่างถูกต้องเหมาะสม ทำให้ผู้ป่วยมีความปลอดภัย ลดระยะเวลาในการรักษาโรคและลดอัตราการเสียชีวิต รวมถึงภาระค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นได้อีกด้วย

เพื่อให้การปฏิบัติงานตามคู่มือเล่มนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด มีข้อเสนอแนะสำหรับผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่ายตั้งแต่ ผู้ปฏิบัติงาน หัวหน้างาน ตลอดจนผู้บริหารองค์กร ดังต่อไปนี้

5.1 ข้อเสนอแนะสำหรับผู้ปฏิบัติงาน ผู้ปฏิบัติงานมีข้อควรคำนึงและปฏิบัติในการปฏิบัติงาน ดังนี้

1. ปฏิบัติตามนโยบาย พันธกิจ มาตรการต่าง ๆ ของฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด และคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

2. เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่ใช้มีการปรับปรุงและพัฒนาเทคโนโลยี จำเป็นที่บุคลากรต้องศึกษา อบรมและเรียนรู้เพิ่มเติม ในส่วนนี้จำเป็นต้องได้รับการทบทวนจากเป็นประจำทุกปี เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง

3. ตระหนักถึงความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน ในการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ป้องกันอย่างถูกวิธี เพื่อป้องกันการติดเชื้อสู่ผู้ปฏิบัติงานและป้องกันการแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม

4. ให้ความสำคัญในการปฏิบัติงาน การใช้งานเครื่องมือหลักที่มีความสำคัญและมูลค่าสูง ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง และทำการดูแลรักษาให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานอยู่เสมอ

5. การแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้า จดบันทึกและรวบรวมปัญหาการใช้งานเครื่อง เพื่อรายงานปัญหาที่พบต่อหน่วยงาน ผู้ร่วมปฏิบัติงานและปรึกษาร่วมกับเจ้าหน้าที่ผู้เชี่ยวชาญของเครื่องมือเพื่อหาแนวทางแก้ไขที่ยั่งยืนต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับหัวหน้าหน่วยงาน หัวหน้างานมีข้อควรปฏิบัติงาน ดังนี้

1. ควบคุม กำกับดูแลและตรวจสอบระบบการปฏิบัติงานให้ดำเนินการเป็นไปมาตรฐาน

2. รับฟังและร่วมแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่พบในการปฏิบัติงาน เช่น การประสานงานกับผู้เชี่ยวชาญหรือช่างประจำเครื่องมือของบริษัท ในการเข้ามาตรวจสอบหรือทำการบำรุงรักษา กรณีที่

เกิดปัญหาในการใช้งานที่ยากเกินกว่าผู้ปฏิบัติงานจะแก้ไขปัญหาได้

3. จัดให้มีการอบรมเพิ่มพูนความรู้ ความสามารถในการปฏิบัติงานให้แก่บุคลากรผู้ปฏิบัติงานอยู่เสมอ ทั้งภาคทฤษฎีและปฏิบัติ จากผู้เชี่ยวชาญของบริษัท เพื่อให้ก้าวทันเทคโนโลยีที่ทันสมัย

4. จัดให้มีวาระการแลกเปลี่ยนความรู้ ปัญหาที่พบ แนวทางในการแก้ไขหรือข้อแนะนำต่าง ๆ ทั้งจากภายในหน่วยงานและระหว่างหน่วยงาน และรวบรวมเพื่อเสนอข้อมูลต่อผู้บริหารในวาระการประชุมต่าง ๆ เช่น การประชุมคณะบริหาร การประชุมคณะกรรมการโรคติดเชื้อ การทำแบบสอบถามข้อมูลการใช้ยาของแพทย์ เพื่อวางแผนการเลือกใช้รูปแบบยาของแต่ละเชื้อ การเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาและอุบัติการณ์ความเสี่ยงต่าง ๆ เป็นต้น

5. ถ่ายทอดนโยบายการปฏิบัติงานให้แก่เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องและครบถ้วนเป็นระบบ ชัดเจน สามารถปฏิบัติได้จริงและตรวจสอบได้

6. การใช้งานเครื่องมือ เครื่องวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper ยี่ห้อ BRUKER รุ่น Microflex มีค่าใช้จ่ายสูงมากในการจัดซื้อน้ำยาและการบำรุงรักษาเชิงป้องกัน (Preventive maintenance) ซึ่งรวมถึงการประกันอะไหล่ของตัวเครื่อง หัวหน้างานมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอต่อผู้บริหารของโรงพยาบาล ชี้แจงและให้เหตุผลถึงความจำเป็นในการดำเนินการดังกล่าว ประโยชน์และความคุ้มค่าที่ได้จากการใช้งานของเครื่องมือที่มีต่อผู้รับบริการและแพทย์ผู้ทำการรักษา ผู้ทำงานวิจัย คณาจารย์จากภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกและภาควิชาต่าง ๆ ของมหาวิทยาลัย

5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับผู้บริหาร

ผู้บริหารมีบทบาทที่สำคัญต่อการบรรลุเป้าหมายขององค์กร มีข้อควรคำนึงและปฏิบัติ ดังนี้

1. บทบาทของการเป็นผู้วางแผน ออกแบบมาตรการและนโยบายการใช้งานเครื่อง MALDI Biotyper ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ให้สอดคล้องกับพันธกิจของมหาวิทยาลัย ดำเนินการและตัดสินใจนโยบายต่าง ๆ โดยคำนึงถึงประโยชน์ขององค์กร ประชาชน และบุคลากรที่ปฏิบัติงานทุกภาคส่วน

2. จัดสรรงบประมาณสำหรับจัดซื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ น้ำยา และงบประมาณสำหรับการบำรุงรักษาเชิงป้องกัน (Preventive maintenance) สำหรับเครื่อง MALDI Biotyper อย่างเพียงพอ พิจารณาถึงเหตุผลและความจำเป็นในการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์ เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ทันสมัยนำมาใช้งาน

3. คำนึงและเล็งเห็นความสำคัญถึงความปลอดภัยด้านโครงสร้าง อาคารและสถานที่ ทั้งต่อผู้ที่มารับบริการและบุคลากรที่ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องได้รับการออกแบบโครงสร้างและมีอุปกรณ์ป้องกันความปลอดภัย โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่ต้องทำงานกับเชื้อจุลชีพโดยตรง จำเป็นต้องมีตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ เป็นต้น รวมทั้งระบบปรับอากาศ เครื่องระบายอากาศ ระบบน้ำและระบบไฟฟ้า ที่มีผลต่อการปฏิบัติการของเครื่อง MALDI Biotyper และเครื่องมืออื่น ๆ

4. สนับสนุนการพัฒนาศักยภาพในด้านต่าง ๆ ของบุคลากรในองค์กร ส่งเสริมให้มีการอบรมเรียนรู้ทักษะทั้งด้านวิชาการและศาสตร์อื่น ๆ เช่น การนำเสนอผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพโดยเครื่อง MALDI Biotyper รวมถึงจัดให้มีการศึกษาดูงานวิธีการใช้งานเครื่องมือแก่ คณาจารย์ นักศึกษา จากมหาวิทยาลัยต่าง ๆ เช่น นักเทคนิคการแพทย์จากโรงพยาบาลพระมงกุฎ โรงพยาบาลตากสิน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เป็นต้น

5. เปิดรับฟังความคิดเห็นและปัญหาของผู้ปฏิบัติงานในการใช้งานเครื่อง MALDI Biotyper พร้อมทั้งสนับสนุนและช่วยหาแนวทางในการแก้ไข

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือมาตรฐานห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ทางการแพทย์และสาธารณสุข. นนทบุรี: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น; 2560
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial. Susceptibility Testing, 33rd Edition. Pennsylvania: Wayne; 2023.
3. Bruker Daltonik. MALDI Biotyper® Changing Microbiology. Germany; 2011
4. Pongsagon Pothavorn. ทำความรู้จักกับ Mas Analyzer แต่ละชนิด (อินเตอร์เน็ต). กรุงเทพฯ: ซายน์ สเปค; 2564 (เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2566). เข้าถึงได้จาก: https://www.scispec.co.th/learning/index.php/blog/chromatography/2018-11-06-05-22-51
5. Bruker Daltonik. MALDI Mass Spectrometry. Germany; 2011
6. ปวีณา เอกพรรณ. เทคนิคมาลดิ-ทอฟ เอ็มเอส (MALDI-TOF MS) สำหรับงานวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร (อินเตอร์เน็ต). กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; (เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2566). เข้าถึงได้จาก: http://tsen.in.th/เทคนิคมาลดิ-ทอฟ เอมเอส-maldi-t/
7. คู่มือการใช้งานเครื่อง MALDI Biotyper รุ่น Microflex. กรุงเทพ ฯ: เวิลด์เทค เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด; 2559.
8. Bruker Daltonik. Microflex User Manual Revision 4. Germany; 2011
9. Bruker Daltonik. FlexSeries Quickstart Manual Version 2.0. Germany; 2011
10. Bruker Daltonik. MALDI Biotyper Protocal Guide. Germany; 2011

ภาคผนวก

ใบรายงานผลการบำรุงรักษาประจำปี 2566 (หน้าที่ 1)

REF 1837645 8269956 8604562 8604784
1853665 8600302 8604673 8605089
1853670 8601800 8604736 8605200
1861000 8603464 8604743 8604784-
8265682 8604561 8604758 BD

BRUKER

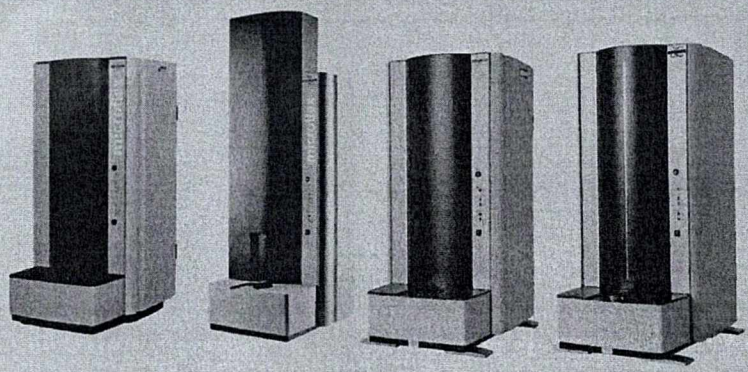
Planned Maintenance

microflex MALDI-TOF Series

Valid only for instruments with the following serial numbers:

Instrument	Serial No.	Part No.
microflex smart LS	ALL	1863882
microflex LT/SH	ALL	8269944 / 8604674
microflex LRF	ALL	8256969 / 8601800
microflex LT/SH smart	ALL	8604832
microflex LT; microflex LT60	ALL	8254472
microflex LRF20 (late)	Dec 2008 onwards	8227917

(valid for DAL00307 and DAL08151)



© Copyright 2021

Purpose:

This document provides a protocol that verifies and records the Planned Maintenance (PM) of analytical instruments installed by Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.

Language: en

Revision K1 (July 2021) Doc. No. 5023971

ใบรายงานผลการบำรุงรักษาประจำปี 2566 (หน้าที่ 2)

Planned Maintenance Record for DAL00307/08151
Planned Maintenance (PM) microflex

BRUKER

Instrument: microflex IVD☐ / CA☐ / GP☐ / RUO☒

Serial Number: 269944.00821

Related Service Report Number: SA-0175201

Maintenance Interval: Twice a year

Company Name: Vajira Hospital

Protocol acceptance / Protocol approval by Bruker Daltonics GmbH & Co. KG

☒ I agree that the procedures and information referenced in the Planned Maintenance document are applicable.

Bruker Daltonics GmbH & Co. KG Certified Engineer

Kittinon/ Field Service Engineer		29-Mar-23
Name / Function (please print)	Signature	Date

Protocol acceptance / Protocol approval by customer

I agree that the procedures and information referenced in the Planned Maintenance document are applicable.

☒ I agree that the Planned Maintenance has been satisfactorily completed and all applicable on-site test criteria have been passed.

Authorized Customer Representative

[illegible]	[illegible]	30 มี.ค. 66
Name / Function (please print)	Signature	Date

Remarks

* Detector replacement is recommended (NOW: OVER 3,000V : 3,051 V_ On the latest check Mar 30, 2023)

Doc. No. 5023971 - PMR - Revision K1
Page 1 of 1

แบบฟอร์ม บันทึกการติดตามควบคุมคุณภาพการวินิจฉัยชนิดของเชื้อ และความไวยา
(F-WI-MI-004/02)

	แบบฟอร์ม บันทึกการติดตามควบคุมคุณภาพการวินิจฉัยชนิดของเชื้อและความไวยา ประจำเดือน ..... พ.ศ. ..... งานจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช	F-WI-MI-004/02

ผู้รับผิดชอบงาน QC ประจำเดือน .....

NO	Colony	Gram	MALDI-TOF Result					
			Date	Date	Date	Date	Date	Date
1	*S. aureus* ATCC 25923	GPC (Cluster)						
2	*K. pneumoniae* ATCC 700603	GNB						
3	*S. aureus* ATCC 29213	GPC (Cluster)						
4	*E. coli* ATCC 25922	GNB						
5	*P. aeruginosa* ATCC 27853	GNB						
6	*E. faecalis* ATCC 29212	GPC (Short chain)						
7	*S.pneumoniae* ATCC 49619	GPC (Diplococci)						
8	*E. faecalis* ATCC 51299	GPC (Short chain)						
9	*K. pneumoniae* ATCC-BAA 1705	GNB						
10								
11								
12	Internal Control kit (*E. coli*)	GNB						
	Calibrate plate 8 peak assigned, std dev.			ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.
	Max peak error			ppm.	ppm.	ppm.	ppm.	ppm.

IQC Phoenix BD กลุ่ม Gram Negative Bacilli รุ่น

AST indicator lot ..... Exp. .....
ID Broth lot ..... Exp. .....
AST Broth lot ..... Exp. .....
NMIC/ID – lot ..... Exp. .....

IQC Phoenix BD กลุ่ม Gram Positive Cocci

AST indicator lot ..... Exp. .....
ID Broth lot ..... Exp. .....
AST Broth lot ..... Exp. .....
PMIC/ID – lot ..... Exp. .....

Rev.01/วันที่บังคับใช้ 11 มกราคม 2563

แบบฟอร์มบันทึกการทดสอบเชื้อมาตรฐาน QC MALDI Biotyper (F-WI-MI-004/04)

QC MALDI Biotyper

งานจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

F-WI-MI-004/04

วัน/เดือน/ปี	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	S. aureus 25923	*K. pneumoniae* 700603	*S. aureus* 29213	*E. coli* 25922	*P. aeruginosa* 27853	*E. faecalis* 29212	*S.pneumoniae* 49619	*E. faecalis* 51299	*K. pneumoniae* 1705			BTS
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ผู้รับผิดชอบงาน QC ประจำเดือน .....

Rev.01/วันที่บังคับใช้ 11 มกราคม 2563

แบบฟอร์มบันทึกการบำรุงรักษา เครื่องวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper (F-LAB-042)

แบบฟอร์มบันทึกการบำรุงรักษาเครื่องวิเคราะห์ชนิดของเชื้อจุลชีพ MALDI Biotyper ประจำ เดือน.....พ.ศ. .....

หน่วย.....จุลชีววิทยา.....

ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

รหัสเครื่องมือ____MBT-MIC-001____ยี่ห้อ____BRUKER____รุ่น____microflex____S/N No.____269944.0082____

F-LAB-042

วันที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
การดูแลรักษาประจำวัน (Daily Maintenance)																															
1. ตรวจสอบสถานะของหัวเครื่อง																															
Stage อยู่ในสถานะ In																															
โปรแกรมพร้อมใช้งาน อยู่ในสถานะ Ready																															
2. ตรวจซีลและทำความสะอาด Stage และ Oring																															
3. ทำความสะอาดบริเวณภายนอกตัวเครื่อง																															
ลงชื่อผู้ปฏิบัติ																															
ผู้ตรวจสอบซ้ำ																															

การดูแลรักษาประจำสัปดาห์ (Weekly Maintenance)	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
วันที่ตรวจสอบ					
1.ตรวจสอบสภาพภายนอกของเครื่อง ปลั๊กไฟต่างๆ					
2.ตรวจสอบระบบการทำงานของเครื่อง					
การดูแลรักษาประจำเดือน (Monthly Maintenance)	1-3 Months				
วันที่ตรวจสอบ					
1. Laser Source Cleaning					
ลงชื่อผู้ปฏิบัติ					
ผู้ตรวจสอบซ้ำ					

วันที่เครื่องมีปัญหา	Corrective action	ผู้บันทึก

วันที่เครื่องมีปัญหา	Corrective action	ผู้บันทึก

วิธีการจดบันทึกข้อมูล

1.ทำเครื่องหมาย / ในช่องข้อมูลที่ปฏิบัติและลงชื่อตัวย่อภาษาอังกฤษในช่องผู้ตรวจสอบทุกครั้ง

2.กรณีไม่ได้บันทึก/ลืมบันทึก ให้เขียนอักษร NR (No Record) ในช่องข้อมูล

ผู้รับผิดชอบ

ผู้จัดการวิชาการ

หัวหน้างาน

(.....)

ตำแหน่ง .....นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ.....

(.....)

ตำแหน่ง .....นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ.....

(.....)

ตำแหน่ง .....นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ.....

Rev.00/ วันที่บังคับใช้ 1 สิงหาคม 2566

เครื่องมือ น้ำยา อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

1) เครื่อง MALDI Biotyper รุ่น Microflex
2) MALDI Target Plate ที่ใช้งานเป็นชนิด 96 หลุม
3) Vortex mixer (Vortex Genie)

2. น้ำยาและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

1) Deionized water
2) Absolute ethanol (EtOH)
3) Acetonitrile (ACN)
4) Formic acid (70%)
5) Trifluoroacetic acid (2.5% TFA)
6) Matrix HCCA, portioned; #8255344
7) Bruker Bacterial test Standard (BTS)

3. อุปกรณ์อื่น

1) ไม้จิ้มฟันหรือแท่งพลาสติกใช้สำหรับการป้ายโคโลนี
2) 0.5-10 µl pipet tips และ a suitable pipet
3) 2-200 µl pipet tips และ a suitable pipet
4) 50-1000 µl pipet tips และ a suitable pipet
5) Disposable gloves

4. วิธีการเตรียม Formic acid (70%)

1) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf
2) ตามด้วยการเติมกรดฟอร์มิก (100%) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร
3) ปิดฝาให้สนิทเขย่าด้วย Vortex ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4) เขียน วัน เดือน ปี และชื่อผู้เตรียม
5) เก็บรักษาในกล่องมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง

5. กรดทีริฟลูโอโรอะเซตไอซีที่เป็นน้ำ 2.5% (TFA)

เป็นสารละลายสำเร็จรูปพร้อมใช้งาน บรรจุในขวดแก้วสีชา ให้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

6. Matrix HCCA

1) นำ 2.5 mg. HCCA (หลอดฝาสีแดง) ออกมาจากตู้เย็น 2-8°ซ.
2) เติม 2.5% (TFA) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
3) ดูดสารละลายผสมขึ้นลงด้วยปิเปตประมาณ 20 ครั้ง ปิดฝาเกลียวให้สนิทและผสมด้วย Vertex ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
4) เขียน วัน เดือน ปี และชื่อผู้เตรียม
5) เก็บรักษาในกล่องมิดชิดในตู้เย็นเก็บน้ำยา อุณหภูมิ 2-8°ซ.

เครื่องมือ น้ำยา อุปกรณ์ (ต่อ)

7. วิธีการเตรียม BTS (Bruker bacterial test standard)

1) นำ BTS (หลอดฝาสีเหลือง) ออกมาจากตู้แช่แข็ง -20°ซ.

2) เติม 2.5% TFA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3) ดูดสารละลายผสมขึ้นลงด้วยปิเปตประมาณ 20 ครั้ง ปิดฝาเกลียวให้สนิทและผสมด้วย Vertex ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4) เขียน วัน เดือน ปี และชื่อผู้เตรียม

5) เมื่อใช้งานเสร็จแล้วให้เก็บรักษาที่ -20°ซ.

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน งานจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด (โทร ๓๑๓๒)

ที่ ..... **วันที่** ๑ มิถุนายน ๒๕๖๕

เรื่อง ขอรับรองการนำคู่มือการปฏิบัติงานมาใช้จริงในฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

เรียน หัวหน้าฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด

เนื่องด้วย ข้าพเจ้า นางสาวธิดาวรรณ เจริญสุข ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ (ตำแหน่งเลขที่ พวช. ๑๒๒๙๐) งานจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ระดับชำนาญการ ได้ดำเนินการจัดคู่มือปฏิบัติงานเรื่อง “วิธีการใช้และดูแลรักษาเครื่องมือของงานจุลชีววิทยา” ในการนี้ ข้าพเจ้ามีความประสงค์ ขอการรับรองว่าได้มีการนำคู่มือการปฏิบัติงานเรื่องดังกล่าวนำไปใช้จริงในการปฏิบัติงานในงานจุลชีววิทยา ฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด เพื่อใช้ประกอบการขอประเมินแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ระดับชำนาญการ

(นางสาวธิดาวรรณ เจริญสุข)
นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ

เรียน หัวหน้าฝ่ายทรัพยากรบุคคล
เพื่อโปรดพิจารณา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุราภรณ์ ภูมิศานติพงศ์)
รักษาการแทนหัวหน้าฝ่ายชันสูตรโรคกลางและธนาคารเลือด
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช