

ลงชื่อประธาน/กรรมการฯ

Omnia



คู่มือการปฏิบัติงาน

เรื่อง การเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ

โดยวิธีปกติ

ของ

นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับปฏิบัติการ

(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12703)

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

ส่วนงานคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

มหาวิทยาลัยนวัตกรรมรัตนราช

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง

นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับชำนาญการ

(ตำแหน่งเลขที่ พวช. 12703)

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

ส่วนงานคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

มหาวิทยาลัยนวมินทราชิราช

คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการฉบับนี้ จัดทำขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานสำหรับนักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง และเป็นมาตรฐานเดียวกัน ซึ่งจะช่วยให้การปฏิบัติงานเป็นไปได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื้อหาของคู่มือนี้ครอบคลุมถึงขั้นตอนการปฏิบัติงาน เทคนิคที่เกี่ยวข้อง ปัญหาที่อาจพบเจอ รวมถึงแนวทางการแก้ไขและข้อเสนอแนะในการปฏิบัติงานเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสูงสุด

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าคู่มือปฏิบัติงานการเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการเล่มนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา และสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานด้านนี้ ในอนาคตได้อย่างยั่งยืน

ผู้จัดทำ

นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ

สิงหาคม 2567

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญแผนภาพ	ค
สารบัญรูปภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ประวัติความเป็นมา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของคู่มือปฏิบัติงาน	2
1.5 คำจำกัดความเบื้องต้น	3
บทที่ 2 ภาระหน้าที่ความรับผิดชอบ	
2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	5
2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ	5
2.3 โครงสร้างองค์กรของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล	6
2.4 โครงสร้างองค์กรของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก	8
บทที่ 3 แนวทางการปฏิบัติงาน	
3.1 ข้อปฏิบัติในการใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา	9
3.2 แนวทางการปฏิบัติงาน	10
3.3 การเตรียม Stock ยา chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml	11
3.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา	11
3.5 การรับส่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ	21
3.6 การเพาะเลี้ยงส่งตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหลอด	22
3.7 การอ่านผลจากหลอดเพาะเลี้ยงส่งตรวจ และวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ	26
3.8 การรายงานผลทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา (โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น)	36
3.9 การควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา	37
บทที่ 4 ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข	40
บทที่ 5 ข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก แบบบันทึกส่งตรวจ Culture for fungus (66)	45
ภาคผนวก ข แบบบันทึกการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา	47
ภาคผนวก ค แบบฟอร์มบันทึกอุณหภูมิตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก	49
ภาคผนวก ง บันทึกข้อความขออนุมัติรายชื่อบุคลากรเพื่อปฏิบัติงานบริการ	51
ประวัติผู้เขียน	54

สารบัญแผนภาพ

	หน้า
แผนภาพที่ 1 โครงสร้างองค์กรของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล	7
แผนภาพที่ 2 โครงสร้างองค์กรของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก	8
แผนภาพที่ 3 แนวทางการปฏิบัติงานการเตรียมส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อรา ทางห้องปฏิบัติการ	10
แผนภาพที่ 4 สูตรการคำนวณความเข้มข้นจาก Stock ยา Chloramphenicol 50 mg/ml ให้มีความเข้มข้นที่ 50 µg/ml ต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA	19

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลของผู้จัดทำขณะปฏิบัติงาน	9
ภาพที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา	13
ภาพที่ 3 การจำลองของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดหลอดเอียง (Slant)	17
มีสัดส่วน 3 ใน 4 ส่วนของหลอดอาหาร	
ภาพที่ 4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดหลอด ได้แก่ SDA SC และ SCC	20
ภาพที่ 5 ภาพ ก ลักษณะแบคทีเรียที่ผ่านการย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	27
ภาพ ข ลักษณะยีสต์ที่ผ่านการย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	
ภาพที่ 6 การ streak เชื้อลงบนเพลท SDA ในแต่ละระนาบ	28
ภาพที่ 7 ลักษณะของราสายที่เจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา	29
ภาพที่ 8 ลักษณะของแผ่น Target ที่ใช้ในการ Smear โคโลนีของยีสต์	30
ลงในแต่ละช่องกลมเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลยีสต์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS	
ภาพที่ 9 ตำแหน่งปุ่มกดต่าง ๆ ของเครื่อง MALDI-TOF MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลยีสต์	31
ภาพที่ 10 หน้าต่างของโปรแกรม flexControl และ โปรแกรม MALDI Biotype RTC	31
ภาพที่ 11 การสร้างไฟล์งานที่หน้าต่างของโปรแกรม MALDI Biotype RTC	32
ภาพที่ 12 การใส่ชื่อไฟล์งานที่ทำการวิเคราะห์ผล	32
ภาพที่ 13 การใส่ชื่อผู้ปฏิบัติงาน (ผู้ปฏิบัติงานเลือกใส่เป็นวันเดือนปีที่วิเคราะห์ผลยีสต์)	33
ภาพที่ 14 หน้าต่างแสดงขั้นตอนการใส่ชื่อในช่องตัวอย่างเชื้อตามตำแหน่งจริงของแผ่น Target	33
ภาพที่ 15 หน้าต่างแสดงการระบุชื่อของตัวอย่างเชื้อตามตำแหน่งจริงของแผ่น Target	34
ภาพที่ 16 การทำงานของเครื่อง MALDI-TOF MS ในระหว่างวิเคราะห์ผลที่ตำแหน่ง B11-B12	34
ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ในตำแหน่ง B11-B12	35

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สัดส่วนปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราในหน่วยกรัม	14
ต่อปริมาตรของน้ำกลั่นในหน่วยมิลลิลิตร	
ตารางที่ 2 สัดส่วนปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับปริมาตรของยา Chloramphenicol	18
ตารางที่ 3 ปัญหา อุปสรรค และแนวทางการแก้ไขปัญหาทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา	40-41

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช เป็นหน่วยงานที่มีบทบาทสำคัญในการให้บริการด้านการศึกษาและงานวิจัยทางการแพทย์ หน่วยงานนี้มีความรับผิดชอบหลักในการสอนในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ หลักการทั่วไปของโรคติดเชื้อ พันธุศาสตร์และการพัฒนามนุษย์สำหรับหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ 2 รวมถึงรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบโลหิตวิทยา และน้ำเหลืองสำหรับหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ 3 นอกจากนี้ยังมีการจัดการเรียนการสอนหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาปฏิบัติการฉุกเฉินการแพทย์ สาขาเทคโนโลยีเครื่องมือแพทย์และห้องผ่าตัด และสาขาอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในสถานพยาบาล รวมถึงการเรียนการสอนหลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต ในรายวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาสำหรับพยาบาล ทางภาควิชา มุ่งมั่นที่จะพัฒนาการศึกษาอย่างต่อเนื่อง โดยเน้นการเรียนรู้ที่ผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง ใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ และมีมาตรฐานในงานวิจัยและวิชาการ ที่ก้าวหน้า มีเอกลักษณ์ด้านเวชศาสตร์เขตเมือง โดยบูรณาการความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ร่วมกับการแพทย์คลินิก และเวชศาสตร์เขตเมือง เพื่อส่งเสริมให้คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาลไปสู่ความเป็นเลิศ ด้านการศึกษา วิจัย และบริการวิชาการ

ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2564 ภาควิชา ได้เปิดให้บริการการตรวจห้องปฏิบัติการพิเศษ Culture for fungus และ *Acanthamoeba* NNE culture โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาวิชาจุลชีววิทยาเป็นผู้รับผิดชอบการตรวจ ซึ่งการให้บริการของภาควิชา ดังกล่าวนอกจากมีอาจารย์เป็นผู้รับผิดชอบการตรวจแล้ว ยังคงมีนักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ ๆ เกี่ยวข้อง ร่วมจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา และสิ่งส่งตรวจ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคและการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรา การเปิดงานบริการนี้เป็นความพยายามในการยกระดับการวินิจฉัยและการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่รวดเร็ว และมีคุณภาพสูงสุด

สำหรับการตรวจเพาะเลี้ยงเชื้อรา (Culture for fungus) นั้น เป็นขั้นตอนสำคัญในการวินิจฉัยการติดเชื้อรา ที่อาจเกิดขึ้นในร่างกายผู้ป่วย กระบวนการนี้เริ่มต้นจากการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากอวัยวะต่าง ๆ โดยทีมแพทย์ พยาบาล เช่น น้ำล้างปอด น้ำจากไขสันหลัง หนอง น้ำจากช่องท้อง หรือของเหลวจากส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย ตัวอย่างชิ้นเนื้อ และตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็นผิวหนัง ขน ผม และเล็บ จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ด้วยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้อุณหภูมิและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน เมื่อพบการเจริญเติบโตของเชื้อราจะมีการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราโดยละเอียด หากพบยีสต์ (Yeast) จะทำการเพิ่มจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ด้วยเทคโนโลยี Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำ ในการระบุชนิดของยีสต์อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ในกรณีที่พบการเจริญเติบโตของราสาย (Mold) จะทำการเพิ่มจำนวนเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษเช่นกัน แต่จะทำการย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue

ซึ่งเป็นสิ่งที่ช่วยให้เห็นโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้สามารถตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของราสายได้อย่างชัดเจน

เนื่องจากงานบริการดังกล่าวข้างต้นเป็นงานบริการที่เปิดใหม่ของทางภาควิชาฯ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการวินิจฉัยและการรักษาของผู้ป่วย จึงจำเป็นต้องมีการจัดทำคู่มือที่มีความถูกต้อง และมีมาตรฐาน เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพในการทำงาน ซึ่งคู่มือนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานและช่วยประโยชน์สูงสุดต่อการตรวจวินิจฉัยและการรักษาของทีมแพทย์

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อกำหนดแนวทางการปฏิบัติงานที่ชัดเจน และถูกต้องในการเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานทุกคนสามารถดำเนินงานได้อย่างเป็นมาตรฐานเดียวกัน ลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการปฏิบัติงาน

1.2.3 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการปฏิบัติงาน ด้วยขั้นตอนและเทคนิคที่เหมาะสม

1.2.4 เพื่อให้สามารถแก้ไขปัญหาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการตรวจ และการเพาะเลี้ยงเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2.5 เพื่อสนับสนุนการวินิจฉัยโรคของทีมแพทย์ โดยเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อรา

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

นักเทคนิคการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์การแพทย์ และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง มีแนวทางที่ชัดเจนและเป็นมาตรฐานในการเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งช่วยลดความผิดพลาด เพิ่มความรวดเร็วและประสิทธิภาพในการปฏิบัติงาน พร้อมทั้งสนับสนุนการวินิจฉัยและรักษาโรคของทีมแพทย์ด้วยข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำ

1.4 ขอบเขตของคู่มือปฏิบัติงาน

คู่มือการเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ครอบคลุมไปถึงขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา การรับสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย การเตรียมสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย การย้อมสิ่งส่งตรวจ การเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมแกรมเพื่อระบุสิ่งส่งตรวจว่ามียีสต์หรือไม่ การเพาะเลี้ยงยีสต์จากหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีสิ่งส่งตรวจ การเพาะเลี้ยงราสายจากหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีสิ่งส่งตรวจ ตลอดจนการวิเคราะห์ผลยีสต์ด้วยเทคโนโลยี Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) และการย้อมราสายด้วยสี lacto phenol cotton blue

1.5 คำจำกัดความเบื้องต้น

1. ยีสต์ (Yeast) หมายถึง สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว มีรูปร่างกลม มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วยการแตกหน่อ
2. ราสาย (Mold) หมายถึง สิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ มีลักษณะเป็นเส้นใย สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนด้วยสปอร์
3. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) หมายถึง เทคโนโลยีการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อทางห้องปฏิบัติการทาง ที่มีความถูกต้องและรวดเร็วสูง
4. Lacto phenol cotton blue หมายถึง สารสีน้ำเงินใช้สำหรับย้อมศึกษาลักษณะโครงสร้างของราสาย
5. Chloramphenicol หมายถึง ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย
6. Conical tube หมายถึง หลอดทดลองฝาเกลียวกันแหลม ซึ่งใช้ในการบรรจุสารเคมี
7. Pipette controller หมายถึง เครื่องควบคุมการดูดจ่ายสารอัตโนมัติใช้สำหรับเคลื่อนย้ายสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ
8. Sterile serological pipette หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้ในวัดปริมาตรสารที่เป็นของเหลว มีขีดบอกปริมาตรการวัดที่มีความละเอียด และความแม่นยำสูง
9. Auto pipette หมายถึง อุปกรณ์สำหรับดูดจ่ายสารละลายชนิดปรับปริมาตรได้ ด้วยการปรับปริมาตรที่ตัวปิเปตต์และดูดจ่ายสารละลายได้ในปริมาตรที่ไม่มาก ซึ่งสามารถวัดปริมาตรได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว
10. Sterile micro centrifuge tube หมายถึง หลอดกันแหลมใช้สำหรับเก็บสารที่เป็นของเหลว
11. Sabouraud dextrose agar (SDA) หมายถึง อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราพื้นฐานชนิดผง ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคส และ peptone มีสถานะเป็นกรดอ่อน pH 5.6 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส
12. Sabouraud dextrose with chloramphenicol (SC) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่เติมยา chloramphenicol ให้มีความเข้มข้น 50 µg/ml เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียประจำถิ่น ในกรณีของสิ่งส่งตรวจชนิด non-sterile
13. Sabouraud cycloheximide chloramphenicol agar (SCC) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่มีส่วนผสมของยา chloramphenicol และ cycloheximide เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียประจำถิ่น และเชื้อราในสิ่งแวดล้อม ในกรณีของสิ่งส่งตรวจชนิด non-sterile กลุ่มผิวหนัง ผม ขน และเล็บ เมื่อสงสัยเชื้อก่อโรคกลุ่ม dermatophytes ที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า
14. เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) หมายถึง เครื่องสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนและแรงดันสูง
15. ตู้ปลอดเชื้อ คลาส 2 หรือ BSC class 2 หมายถึง ตู้ชีวนิรภัยที่สามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ไปสู่ผู้ปฏิบัติงาน สิ่งแวดล้อม และชิ้นงาน
16. Autoclave tape หมายถึง เทปที่ใช้เพื่อตรวจสอบการฆ่าเชื้อว่าถึงตามเกณฑ์ที่สามารถฆ่าเชื้อได้หรือไม่ โดยเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เทปจะเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลไปเป็นสีดำ

17. Sterile pasteur pipette หมายถึง อุปกรณ์ดูดจ่ายสารที่มีปลายหลอดหยดเล็ก ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
18. Smear หมายถึง การเกลี่ยเชื้อบนกระจกสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป
19. Sterile forceps หมายถึง อุปกรณ์ที่ใช้ในการคีบชิ้นเนื้อ โดยปลายด้านที่ไม่ได้ติดกันไว้สำหรับคีบจับชิ้นเนื้อ ซึ่งอยู่ในสภาพที่ปราศจากเชื้อ
20. โคโลนี หมายถึง ยีสต์ หรือแบคทีเรียที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากเซลล์เดียวเป็นหลาย ๆ เซลล์จนมีขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ
21. Sterile loop หมายถึง พลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ปลายเรียบมนเหมาะสำหรับการเชี่ยเชื้อ
22. ย้อมแกรม หมายถึง เทคนิคในการศึกษาแบคทีเรียโดยดูสีที่ย้อมติดกับตัวจุลินทรีย์ ลักษณะการย้อมติดที่ตัวเซลล์เป็นแบบ differential strain
23. โคนิเดีย หมายถึง โครงสร้างของสปอร์ที่ไม่มีสิ่งหุ้ม อยู่บริเวณปลายของราสาย และทำหน้าที่ในการชูสปอร์

บทที่ 2

ภาระหน้าที่ความรับผิดชอบ

2.1 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

ภาระหน้าที่ของนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก รับผิดชอบในการจัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี สิ่งส่งตรวจ และ Demonstration สำหรับการเรียนการสอนด้านปฏิบัติการของนักศึกษาแพทย์ ชั้นปีที่ 2 ในรายวิชาระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ หลักการทั่วไปของโรคติดเชื้อ พันธุศาสตร์และการพัฒนามนุษย์ และนักศึกษาแพทย์ชั้นปีที่ 3 ในรายวิชาระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบโลหิตวิทยาและน้ำเหลือง สำหรับนักศึกษาพยาบาล นักศึกษาสาขาปฏิบัติการฉุกเฉินการแพทย์ สาขาเทคโนโลยีเครื่องมือแพทย์และห้องผ่าตัด และสาขาอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในสถานพยาบาลในรายวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คอยควบคุม ดูแลนักศึกษา บริหารจัดการ และแก้ปัญหาเบื้องต้นต่าง ๆ ในระหว่างที่มีการเรียนการสอนปฏิบัติการ บริหารความเสี่ยงของห้องปฏิบัติการ ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทางห้องปฏิบัติการ แก่บุคลากรด้านสาธารณสุข นักศึกษาแพทย์ นักศึกษาพยาบาล นักศึกษาวิทยาศาสตร์สุขภาพ และผู้ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการติดต่อประสานงานการซ่อมบำรุงรักษาเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการให้พร้อมใช้งานอยู่เสมอ และให้บริการผู้ป่วยในส่วนของงานบริการห้องปฏิบัติการพิเศษ ได้แก่ การตรวจ Antinuclear antibody (ANA) การตรวจ Culture for fungus และ *Acanthamoeba* NNE culture

2.2 ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

สำหรับตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับปฏิบัติการ สังกัดภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชินี มีหน้าที่ความรับผิดชอบ ดังนี้

2.2.1 จัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี สิ่งส่งตรวจ และ Demonstration สำหรับการเรียนการสอนด้านปฏิบัติการของนักศึกษาแพทย์ นักศึกษาพยาบาล นักศึกษาสาขาปฏิบัติการฉุกเฉินการแพทย์ สาขาเทคโนโลยีเครื่องมือแพทย์และห้องผ่าตัด และสาขาอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในสถานพยาบาล

2.2.1.1 จัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์สำหรับการเรียนการสอนด้านปฏิบัติการให้นักศึกษา

2.2.1.2 จัดเตรียมสิ่งส่งตรวจ ตัวอย่างเชื้อ และ Demonstration สำหรับการเรียนสอนปฏิบัติการ

2.2.1.3 จัดทำเอกสารและสื่อเพื่อใช้ในการเรียนการสอนปฏิบัติการ

2.2.1.4 ควบคุม ดูแลนักศึกษา บริหารจัดการ และแก้ปัญหาเบื้องต้นต่าง ๆ ในระหว่างที่มีการเรียนการสอนปฏิบัติการ และจัดเก็บอุปกรณ์หลังการเรียนการสอนเสร็จสิ้น

2.2.2 จัดเตรียมสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเอกสารในการจัดสอบปฏิบัติการ

2.2.3 คุมสอบนักศึกษาในระหว่างที่มีการสอบภาคปฏิบัติ

- 2.2.4 ดูแลความเรียบร้อย ควบคุม บำรุงรักษาเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และการใช้สารเคมี
 - 2.2.4.1 บำรุงรักษาเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ปีละ 2 ครั้ง
 - 2.2.4.2 แก้ไขปัญหาเครื่องมือกรณีเกิดการเสียนับพลัน
 - 2.2.4.3 ดูแล ตรวจสอบ บันทึกการใช้งานและจัดเก็บสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
 - 2.2.4.4 ดูแล ตรวจสอบ บันทึกการใช้งานเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการ
- 2.2.5 ดูแลความเรียบร้อย บริหารความเสี่ยง ห้องปฏิบัติการ ห้องเตรียมสารเคมี ห้องเก็บเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (รับผิดชอบห้องปฏิบัติการ 602 และ 603 ตึกพยาธิ และห้องปฏิบัติการ 401-410 ตึกเกษมศรี สำนักงานอธิการบดี)
- 2.2.6 สอนและให้คำแนะนำ การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ทางห้องปฏิบัติการ แก่บุคลากรด้านสาธารณสุข นักศึกษาแพทย์ นักศึกษาพยาบาล นักศึกษาวิทยาศาสตร์สุขภาพ และผู้ที่เกี่ยวข้อง
- 2.2.7 จัดทำคู่มือการใช้งานเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์
- 2.2.8 งานบริการห้องปฏิบัติการพิเศษ ได้แก่ CP-Microbiology และ CP-Immunology
 - 2.2.8.1 การรับส่งส่งตรวจสำหรับ CP-Microbiology และ CP-Immunology
 - 2.2.8.2 การเตรียมส่งส่งตรวจสำหรับ CP-Microbiology และ CP-Immunology และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ CP-Microbiology
 - 2.2.8.3 การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ
 - 2.2.8.4 การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการภายใต้การควบคุมของอาจารย์ผู้รับผิดชอบงานบริการสำหรับ CP-Microbiology
- 2.2.9 จัดเตรียมข้อมูลเพื่อการจัดซื้อจัดจ้างเวชภัณฑ์ พัสดุ งานจ้างเหมาบริการบำรุงรักษาและซ่อมแซม แก้ไขเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

2.3 โครงสร้างองค์กรของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

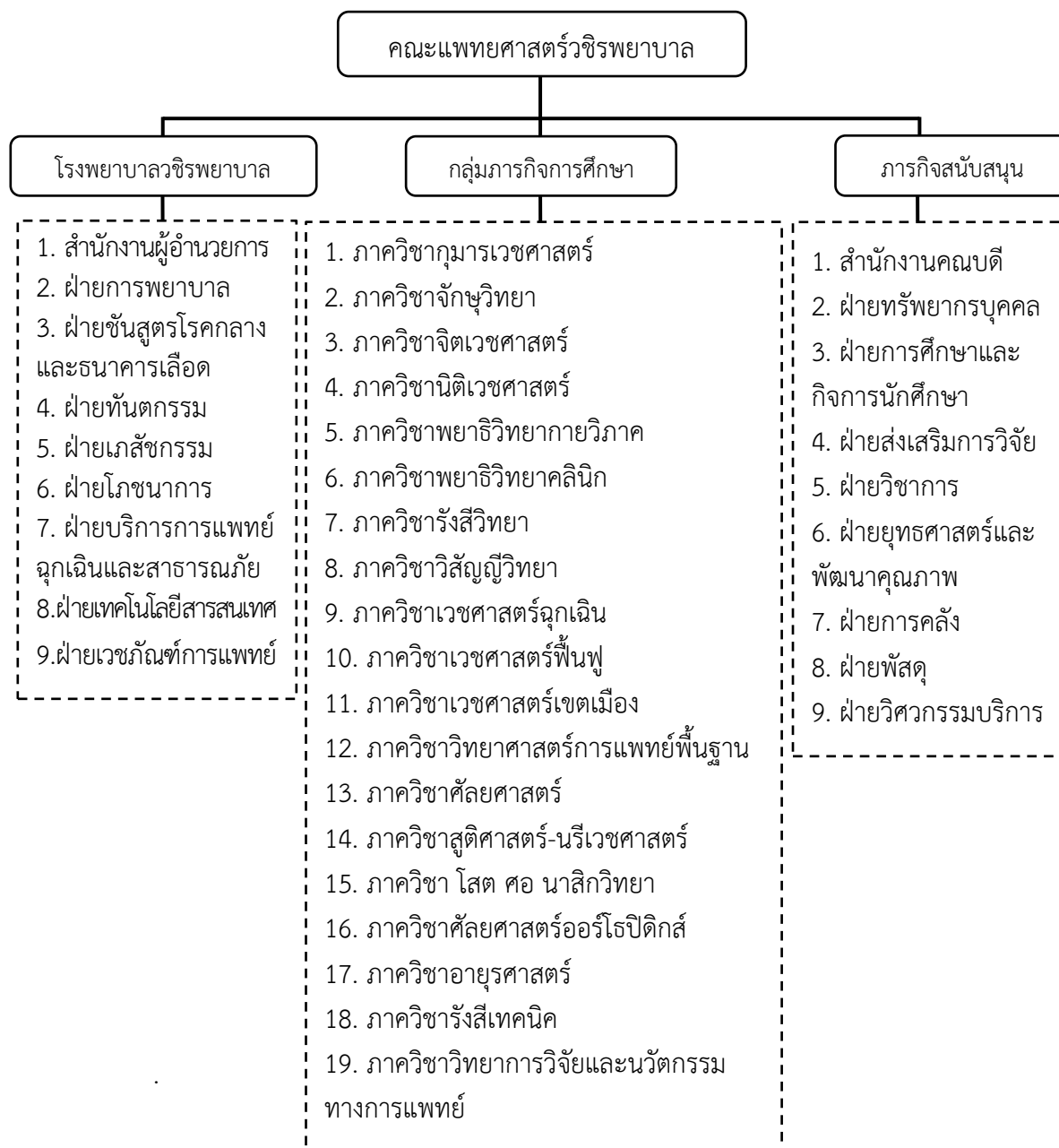
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช เป็นสถาบันอุดมศึกษา ถือกำเนิดจากโรงพยาบาลวชิรพยาบาล ก่อตั้งเมื่อวันที่ 2 มกราคม พ.ศ. 2455 ซึ่งคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาลเป็นคณะหนึ่งของมหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช และเป็นมหาวิทยาลัยแห่งสุดท้ายที่พระบาทสมเด็จพระบรมชนกาธิเบศร มหาภูมิพลอดุลยเดชมหาราช บรมนาถบพิตร ได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าโปรดกระหม่อมพระราชทานชื่อมหาวิทยาลัยว่า มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช มีบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบเกี่ยวกับการบริหารทางการศึกษา การควบคุมการสอน และจัดการระบบการศึกษา เพื่อผลิตบัณฑิตและบุคลากรทางการแพทย์ทุกระดับ ตลอดจนผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางหลายสาขา พัฒนาหลักสูตรการเรียนการสอนและปรับปรุงการศึกษาทางการแพทย์ให้ได้มาตรฐานสากล ส่งเสริม สนับสนุน ค้นคว้า และวิจัยทางการแพทย์ พร้อมทั้งให้บริการทางการแพทย์ที่มีคุณภาพแก่ประชาชน การบำบัด การส่งเสริมสุขภาพอนามัยและป้องกันโรค และให้บริการวิชาการแก่สังคม โดยดำเนินงานภายใต้ 3 พันธกิจหลัก

พันธกิจในการดำเนินงานของทางคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช มีดังนี้
พันธกิจที่ 1 ผลิตบัณฑิตแพทย์ แพทย์ผู้เชี่ยวชาญ และบุคลากรด้านสุขภาพ ที่มีจิตสาธารณะ และมีความเชี่ยวชาญด้านเวชศาสตร์เขตเมือง ซึ่งเป็นอัตลักษณ์ และเอกลักษณ์ของวชิรพยาบาล

พันธกิจที่ 2 จัดบริการด้านการแพทย์และสุขภาพ

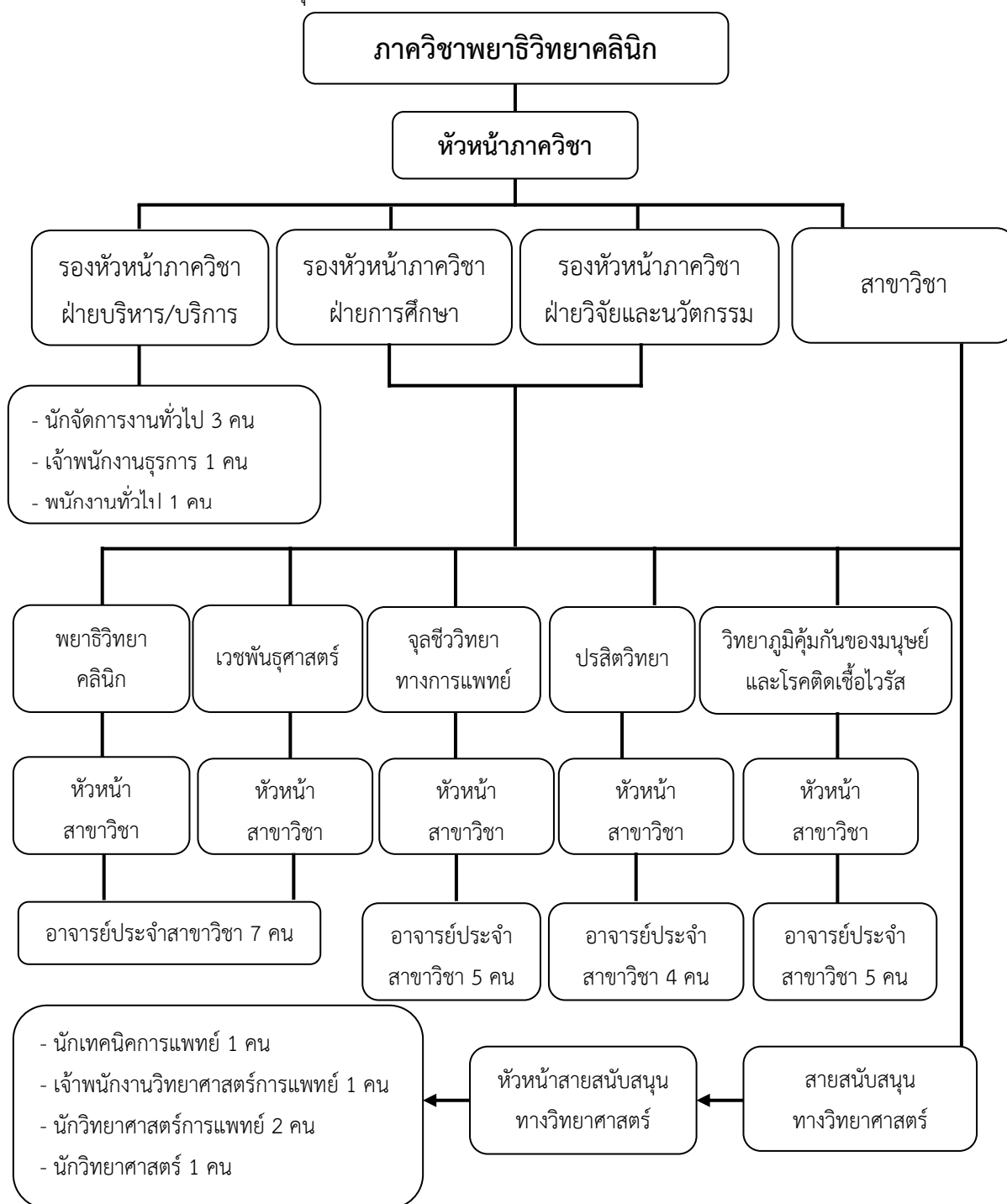
พันธกิจที่ 3 การสร้างองค์ความรู้ วิจัย และนวัตกรรมที่มีคุณภาพสูง ได้มาตรฐานสากล ด้วยเทคโนโลยียุคดิจิทัล เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของกรุงเทพมหานครและประเทศ



แผนภาพที่ 1 โครงสร้างองค์กรของคณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

2.4 โครงสร้างองค์กรของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก เป็นหน่วยงานที่แยกออกจากภาควิชาพยาธิวิทยา เพื่อเน้นด้านการเรียนการสอน และการให้บริการเป็นสำคัญ และหลังจากที่ทางมหาวิทยาลัยได้รับพระราชทานนามมหาวิทยาลัยว่า "มหาวิทยาลัยนวมินทราชิตราชนคร" จึงได้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใหม่ โดยมีการแยกส่วนของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก ออกเป็น 2 ส่วนงาน ส่วนงานที่หนึ่ง คือ ฝ่ายชั้นสูตรโรคกลางและธนาคารเลือดเป็นงานบริการที่อยู่ในการบริหารงานของโรงพยาบาล และส่วนงานที่สอง คือ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกซึ่งมีบทบาทหน้าที่ให้บริการด้านการศึกษามาจนถึงปัจจุบัน โดยมีโครงสร้างการบริหารงาน ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 โครงสร้างองค์กรของภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

บทที่ 3

แนวทางการปฏิบัติงาน

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกนั้น เป็นห้องปฏิบัติการที่เปิดให้บริการด้านการตรวจวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วย เพื่อวิเคราะห์เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค ด้วยกระบวนการนำตัวอย่างของผู้ป่วยจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ สิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว สิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อ และสิ่งส่งตรวจที่เก็บตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ขน ผม และเล็บ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยอ่านผลการเจริญเติบโตของเชื้อราตามรอบที่ทางห้องปฏิบัติการกำหนด ซึ่งการปฏิบัติงานดังกล่าวเป็นการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรง ดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องมีความระมัดระวัง และคำนึงถึงความปลอดภัยในขณะปฏิบัติงาน ภายใต้ข้อปฏิบัติในการใช้ห้องปฏิบัติการ

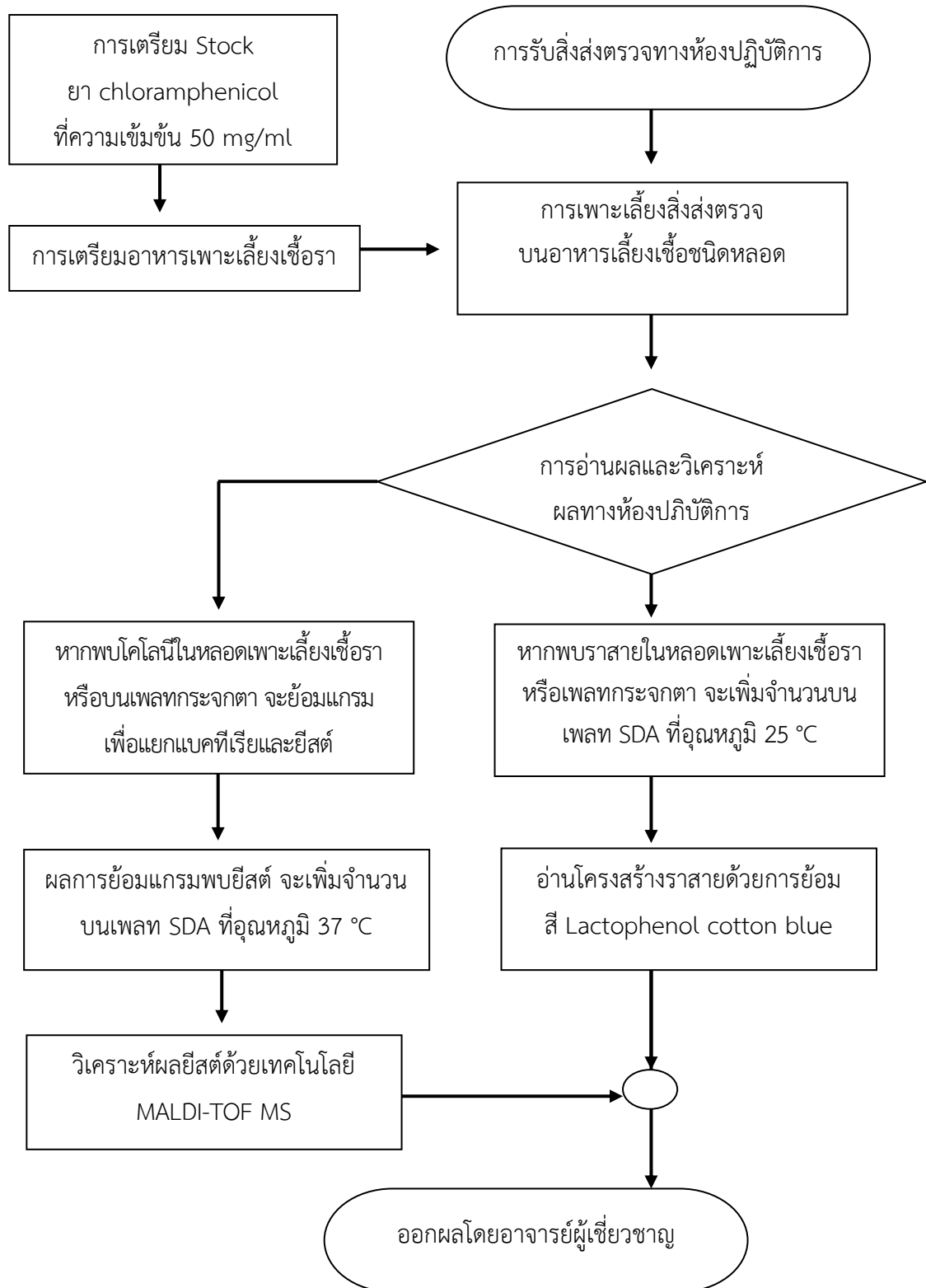
3.1 ข้อปฏิบัติในการใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

- 3.1.1 สวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลทุกครั้งขณะปฏิบัติงาน ดังภาพที่ 1
- 3.1.2 ห้ามนำอาหาร หรือเครื่องดื่มเข้ามาเก็บหรือรับประทาน
- 3.1.3 ห้ามนำเครื่องแก้วหรือภาชนะในห้องปฏิบัติการไปรองรับอาหาร
- 3.1.4 ห้ามนำเด็กหรือสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ เข้ามาในห้องปฏิบัติการ
- 3.1.5 ห้ามวิ่งเล่นหรือหยอกล้อกันในขณะที่ปฏิบัติงาน
- 3.1.6 ห้ามทำกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแต่งใบหน้า และ รวบผมทุกครั้งขณะปฏิบัติงาน
- 3.1.7 รักษาความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงาน และทำความสะอาดทุกครั้งทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติงาน
- 3.1.8 ทิ้งขยะแต่ละประเภทให้ถูกตำแหน่งของถังขยะ
- 3.1.9 ล้างมือทุกครั้งก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 1 การสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลของผู้จัดทำขณะปฏิบัติงาน โดยสวมใส่เสื้อกาวน์ ที่พอดิตัว สวมรองเท้าหุ้มปิด รวบผมให้เรียบร้อย และสวมใส่ถุงมือทุกครั้งขณะปฏิบัติงาน

3.2 แนวทางการปฏิบัติงาน



แผนภาพที่ 3 แนวทางการปฏิบัติงานการเตรียมส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ

3.3 การเตรียม Stock ยา chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

Chloramphenicol จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยการเข้าไปทำลายโปรตีนที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรีย จนทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้น เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากร่างกายของมนุษย์ ซึ่งโดยปกติแล้ว ร่างกายของมนุษย์จะประกอบไปด้วยแบคทีเรียที่อาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ดังนั้น จำเป็นต้องเติมยาชนิดนี้ลงไปในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และทำให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี ยาชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (50 µg/ml) ซึ่งเตรียมได้จาก stock ยาที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (50 mg/ml) โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. กดปุ่มเปิดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รอจนเครื่องชั่งปรากฏหน้าจอบอกปริมาณ จากนั้นวางกระดาดชั่งสารลงที่จานชั่ง และกดปุ่ม tare เพื่อให้เครื่องชั่งหักปริมาณน้ำหนักของกระดาดชั่งสารเคมีออก รอจนเครื่องชั่งขึ้นปริมาณเป็น 0 กรัม
2. ใช้ช้อนตักสารเคมีสแตนเลสที่มีหน้ากว้างขนาด 1.3 เซนติเมตร ยาว 21 เซนติเมตร ตักผงยา chloramphenicol ลงบนกระดาดชั่งสารเคมี ให้มีปริมาณ 0.5 กรัม
3. เทผง chloramphenicol ปริมาณ 0.5 กรัม ลงใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
4. บีบเปิดสาร absolute ethanol ด้วย Pipette controller ผ่าน sterile serological pipette ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน conical tube
5. ปิดฝา conical tube ให้แน่น และเขย่าขึ้นลง จำนวน 7-10 ครั้ง เพื่อให้ยาเกิดการละลายจนเป็นน้ำใส หรือเขย่าจนกว่ายาจะละลายจนหมด
6. เมื่อผง chloramphenicol ละลายจนเป็นน้ำใสแล้ว ให้แบ่งยาที่ละลายแล้วด้วย Auto pipette ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน sterile micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด
7. เขียนระบุความเข้มข้นของยา และวันเดือนปีกำกับไว้ที่หลอด micro centrifuge tube ตัวอย่างเช่น chloramphenicol 50 mg/ml (16/8/67) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้งานในครั้งถัดไป

3.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

อาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture media) หมายถึง อาหารที่มีส่วนประกอบของสารอาหารซึ่งเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้น จะมีความต้องการของสารอาหาร สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่แตกต่างกัน และไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นั้น ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีธาตุอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. มีความเป็นกรดและด่าง (pH) ที่เหมาะสม
3. ปราศจากสารพิษที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
4. ปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทางห้องปฏิบัติการนั้น มีคุณสมบัติที่เหมือนกัน คือใช้ในการเพิ่มจำนวนในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่มีชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้งาน ผู้ใช้งานสามารถจำแนกชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงได้ 3 ชนิด ดังนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (solid media หรือ nutrient agar) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมหลัก คือ วุ้น (agar) ตามปกติใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยจะใช้งานในรูปแบบของจานแก้ว หรือจานพลาสติก หรืออยู่รูปแบบของหลอดทดสอบที่มีผิวหน้าเอียงเรียกว่า slant หรือ slope ส่วนอาหารในหลอดทดสอบที่มีผิวหน้าไม่เอียงนั้น จะเรียกว่า deep tube เพื่อใช้เพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (semisolid media) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมวุ้นลงไป ในปริมาณที่ต่ำกว่า solid media คือ ประมาณร้อยละ 0.5 หรือน้อยกว่า

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (liquid media, broth หรือ nutrient broth) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้เติมวุ้น ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลว

ทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก มหาวิทยาลัยนวมินทราชินี เป็นการเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจจากตัวอย่างผู้ป่วยบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดแข็งในหลอดทดสอบที่มีผิวหน้าเอียง หากพบการเจริญเติบโตของยีสต์หรือราสาย จะนำเชื้อมาเติมเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในจานพลาสติกเพื่อระบุชนิดของเชื้อราได้อย่างถูกต้อง ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนี้ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ SDA อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ SC และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ SCC

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อพื้นฐานชนิดผง ซึ่งเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคส และ peptone มีสภาวะเป็นกรดอ่อน pH 5.6 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose with chloramphenicol (SC) นั้น เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่เติมยา chloramphenicol ให้มีความเข้มข้น 50 µg/ml เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียประจำถิ่น ในกรณีของสิ่งส่งตรวจชนิด non-sterile และอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud cycloheximide chloramphenicol agar (SCC) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่มีส่วนผสมของยา chloramphenicol และ cycloheximide เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียประจำถิ่นและเชื้อราในสิ่งแวดล้อม ในกรณีของสิ่งส่งตรวจชนิด non-sterile กลุ่มผิวหนัง ผง ขน และเล็บ เมื่อสงสัยเชื้อก่อโรคกลุ่ม dermatophytes ที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า

3.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

อุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากจะทำให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถเตรียมปริมาณสารอาหารได้อย่างแม่นยำ และมีสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรามากที่สุด ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังนี้

1. อาหารสำเร็จรูป SDA และ SCC ชนิดผง สำเร็จรูป
2. น้ำกลั่น (Distilled water)
3. ขวดดูแรน (Duran)
4. ปีกเกอร์ (Beaker)
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digits)
6. จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ (Sterilized petri dish plastic)
7. กระบอกตวง (Cylinder)
8. แท่งแก้วคนสาร (Glass stirring rod)
9. กระดาษชั่งสาร (Weighing paper) และ ช้อนตักสาร (Spatula)
10. เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
11. หลอดแก้วฝาเกลียวมีฝาปิด สำหรับใส่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ขนาด 18×75 มิลลิเมตร
12. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Pipette controller)
13. Sterile serological pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
14. ตู้ปลอดเชื้อ คลาส 2 หรือ BSC class 2 (ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ชนิดปราศจากเชื้อ)
15. Rack สแตนเลสสำหรับใส่หลอดอาหาร
16. Auto pipette 1,000 ไมโครลิตร
17. จานชั่งสาร (Weighing boat)



ภาพที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

3.4.2 การคำนวณปริมาณอาหารสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

การคำนวณอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้น สามารถคำนวณโดยยึดตามปริมาณของอาหารที่ต้องชั่งจากฉลากข้างขวด (กล่าวคือ ปริมาณในหน่วยกรัมของอาหารสำเร็จรูป ที่ต้องละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หรือ 1,000 มิลลิลิตร) จากฉลากข้างขวดของอาหาร

สำหรับการคำนวณจะคำนวณจากฉลากข้างขวด เช่น ฉลากข้างขวดกำหนดให้ชั่งอาหาร 65 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งวิธีการคำนวณนั้นผู้ปฏิบัติงานจะเป็นผู้กำหนดปริมาตรที่ต้องใช้งานก่อน และจึงคำนวณปริมาณของอาหารที่ต้องการชั่งน้ำหนักเพื่อให้ได้สารอาหารในปริมาตรที่กำหนด ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการเตรียมอาหารปริมาตร 800 มิลลิลิตร จะต้องชั่งอาหาร 52 กรัม หรือถ้าต้องการเตรียมอาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร จะต้องชั่งอาหาร 32.5 กรัม

อาหาร SC เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่สามารถเตรียมได้จากอาหาร SDA และมีการเติมยา Chloramphenicol ตามปริมาตรของอาหาร โดยให้ยาพร้อมใช้งานที่ความเข้มข้น 50 ug/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

อาหาร Sabouraud cycloheximide chloramphenicol (SCC) จากฉลากข้างขวดอาหารนั้น กำหนดให้ชั่งอาหาร 45.54 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดังนั้น ถ้าต้องการเตรียมอาหารปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต้องชั่งอาหาร 22.77 กรัม

ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรานั้น หากผู้ปฏิบัติงานมีการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรายี่ห้ออื่นซึ่งแตกต่างจากที่กล่าวมาข้างต้น ผู้ปฏิบัติงานสามารถคำนวณได้โดยการยึดตามปริมาณของอาหารจากฉลากข้างขวดเป็นหลัก และคำนวณเทียบตามสัดส่วนปริมาตรของอาหารได้โดยตรง แต่ถ้าผู้ใช้งานใช้ยี่ห้อที่มีปริมาณเท่ากับที่กล่าวมาข้างต้น สามารถเตรียมได้ตามสัดส่วนในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัดส่วนปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราในหน่วยกรัมต่อปริมาตรของน้ำกลั่นในหน่วยมิลลิลิตร

ปริมาตรของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (กรัม)	ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ SCC (กรัม)
1,000	65	45.54
900	58.5	40.986
800	52	36.432
700	45.5	31.878
600	39	27.324
500	32.5	22.77
400	26	18.216
300	19.5	13.662
200	13	9.108
100	6.5	4.554

3.4.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

3.4.3.1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ชนิดเพลท

1. กดปุ่มเปิดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รอนจนเครื่องชั่งปรากฏหน้าจอบอกปริมาณ จากนั้นวางจานชั่งสารเคมีลงที่จานชั่งสารของเครื่องชั่ง และกดปุ่ม tare เพื่อให้เครื่องชั่งหักปริมาณน้ำหนักของกระดาศชั่งสารเคมีออก รอนจนเครื่องชั่งขึ้นปริมาณเป็น 0 กรัม

2. ใช้ช้อนตักสารเคมี ตวงผงอาหารลงในจานชั่งสารเคมีที่อยู่บนเครื่องชั่ง จนกว่าจะได้ตามปริมาณที่คำนวณไว้

3. เทผงอาหารตามปริมาณที่ชั่งได้ ลงในขวดดูแรน และตวงปริมาตรของน้ำกลั่น ด้วยกระบอกตวง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ผ่านการตวงปริมาตรลงในขวดดูแรนที่มีผงอาหาร ซึ่งในระหว่างที่ผู้ปฏิบัติงานเทน้ำกลั่นลงในขวดดูแรนนั้น ให้ผู้ปฏิบัติงานเขย่าขวดอาหารเบา ๆ เพื่อให้อาหารเกิดการกระจายตัว

4. ปิดปากขวดดูแรนให้สนิท และเขย่าขวดประมาณ 7-10 ครั้ง เพื่อให้ผงอาหารกระจายตัว และป้องกันการจับกันเป็นก้อนของผงอาหารภายในขวด

5. คลายฝาเกลียวของขวดดูแรนลงเล็กน้อย และห่อปิดบริเวณฝาขวดดูแรนด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์และตามด้วยการติด Autoclave tape จากนั้นเขียนระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ที่บริเวณข้างขวด

6. นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราวางลงในเครื่อง Autoclave เพื่อทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยเครื่องชนิดนี้สามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งผู้ปฏิบัติงานสามารถเสียบปลั๊กไฟฟ้าของเครื่อง Autoclave เข้ากับเต้ารับ และกดปุ่มเปิดสวิทช์ของเครื่อง จากนั้นวางขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราลงในเครื่องและหมุนปิดฝาของเครื่อง Autoclave ให้แน่นสนิท และกดปุ่ม Start ตรงบริเวณแถบคำสั่งของเครื่อง Autoclave เนื่องจากเครื่องดังกล่าวตั้งค่าอุณหภูมิ แรงดันไอน้ำ และ ระยะเวลาในการทำงานไว้เป็นสากล

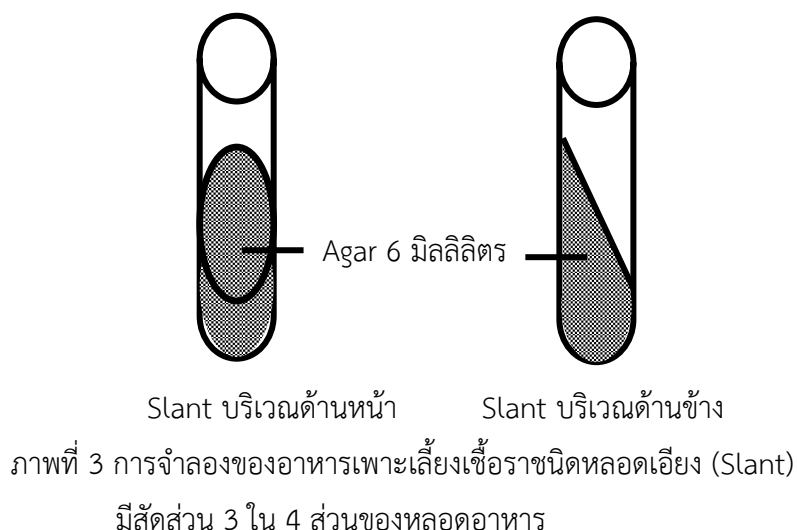
7. เมื่อเครื่อง Autoclave ทำงานเสร็จเรียบร้อยแล้ว และปรากฏหน้าจอแสดงอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส ให้ผู้ปฏิบัติงานกดปุ่ม Stop ตรงบริเวณแถบคำสั่งของเครื่อง Autoclave และหมุนเปิดฝา เพื่อนำขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราออกจากเครื่อง Autoclave

8. วางขวดอาหารในตู้ BSC class 2 จนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรามีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นให้เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ และวางไว้จนกว่าอาหารแข็งตัว

9. เขียนระบุ คำว่า SDA ลงบนเพลทพลาสติกที่มุมใดมุมหนึ่งบริเวณขอบเพลท เพื่อระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเพลท และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งานครั้งถัดไป

3.4.3.2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ชนิดหลอด

1. กดปุ่มเปิดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รอจนเครื่องชั่งปรากฏหน้าจอบอกปริมาณ จากนั้นวางจานชั่งสารเคมีลงในจานชั่งสารของเครื่องชั่ง และกดปุ่ม tare เพื่อให้เครื่องชั่งหักปริมาณ น้ำหนักของกระตาดชั่งสารเคมีออก รอจนเครื่องชั่งขึ้นปริมาณเป็น 0 กรัม
2. ใช้ช้อนตักสารเคมี ตวงผงอาหารลงในจานชั่งสารเคมีที่อยู่บนเครื่องชั่ง จนกว่าจะได้ตามปริมาณที่คำนวณไว้
3. เทผงอาหารตามปริมาณที่ชั่งได้ ลงในขวดดูแรน และตวงปริมาตรของน้ำกลั่น ด้วยกระบอกตวง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ผ่านการตวงปริมาตรลงในขวดดูแรนที่มีผงอาหาร ซึ่งในระหว่างที่ผู้ปฏิบัติงานเทน้ำกลั่นลงในขวดดูแรนนั่น ให้ผู้ปฏิบัติงานเขย่าขวดอาหารเบา ๆ เพื่อให้อาหารเกิดการกระจายตัว
4. ปิดปากขวดดูแรนให้สนิท และเขย่าขวดประมาณ 7-10 ครั้ง เพื่อให้ผงอาหารกระจายตัว และป้องกันการจับกันเป็นก้อนของผงอาหารภายในขวด
5. คลายฝาเกลียวของขวดดูแรนลงเล็กน้อย และห่อปิดบริเวณฝาขวดดูแรนด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์และตามด้วยการติด Autoclave tape จากนั้นเขียนระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ที่บริเวณข้างขวด
6. นำหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิด ขนาด 18x75 มิลลิเมตร เรียงลงใน Rack สแตนเลส และปิดฝาหลอดแบบหลวม เพื่อสำหรับใส่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา หลังผ่านการทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำ Rack ใส่ในถุงร้อนขนาดกว้าง 20 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว และมีด้ายปิดถุงร้อนให้สนิท ตามด้วยการติด Autoclave tape บริเวณใดบริเวณหนึ่งของถุงร้อน
7. นำขวดอาหารในข้อ 5 และหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิดในข้อ 6 วางลงในเครื่อง Autoclave เพื่อทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
8. เมื่อเครื่อง Autoclave ทำงานเสร็จเรียบร้อยแล้ว และปรากฏหน้าจอแสดงอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส ให้ผู้ปฏิบัติงานกดปุ่ม Stop ตรงบริเวณแถบคำสั่งของเครื่อง Autoclave และหมุนเปิดฝา เพื่อนำหลอดแก้วและขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราออกจากเครื่อง Autoclave
9. วางหลอดแก้วและขวดอาหารในตู้ BSC class 2 รอจนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตอาหารด้วย Pipette controller ผ่าน Serological pipette ลงในหลอดแก้วให้มีปริมาตรหลอดละ 6 มิลลิลิตร และวางเอียง (Slant) ให้มีสัดส่วน 3 ใน 4 ส่วนของหลอดอาหาร ดังภาพที่ 3



10. เมื่ออาหารแข็งตัวเรียบร้อยแล้วดังภาพที่ 4 ให้ผู้ปฏิบัติงานเขียนระบุ คำว่า SDA ที่บริเวณด้านข้างของหลอดแก้ว เพื่อระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งานครั้งถัดไป

3.4.3.3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC ชนิดหลอด

1. กดปุ่มเปิดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รอจนเครื่องชั่งปรากฏหน้าจอบอกปริมาณ จากนั้นวางจานชั่งสารเคมีลงที่จานชั่งสารของเครื่องชั่ง และกดปุ่ม tare เพื่อให้เครื่องชั่งหักปริมาณ น้ำหนักของกระดาดชั่งสารเคมีออก รอจนเครื่องชั่งขึ้นปริมาณเป็น 0 กรัม

2. ใช้ช้อนตักสารเคมี ตวงผงอาหารลงในจานชั่งสารเคมีที่อยู่บนเครื่องชั่ง จนกว่าจะได้ ตามปริมาณที่คำนวณไว้

3. เทผงอาหารตามปริมาณที่ชั่งได้ ลงในขวดตุรเรน และตวงปริมาตรของน้ำกลั่น ด้วยกระบอกตวง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ผ่านการตวงปริมาตรลงในขวดตุรเรนที่มีผงอาหาร ซึ่งในระหว่าง ที่ผู้ปฏิบัติงานเทน้ำกลั่นลงในขวดตุรเรนนั่น ให้ผู้ปฏิบัติงานเขย่าขวดอาหารเบา ๆ เพื่อให้อาหาร เกิดการกระจายตัว

4. ปิดปากขวดตุรเรนให้สนิท และเขย่าขวดประมาณ 7-10 ครั้ง เพื่อให้ผงอาหาร กระจายตัว และป้องกันการจับกันเป็นก้อนของผงอาหารภายในขวด

5. คลายฝาเกลียวของขวดตุรเรนลงเล็กน้อย และห่อปิดบริเวณฝาขวดตุรเรนด้วยแผ่น อะลูมิเนียมฟอยล์และตามด้วยการติด Autoclave tape จากนั้นเขียนระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ไว้ที่บริเวณข้างขวด

6. นำหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิด ขนาด 18×75 มิลลิเมตร เรียงลงใน Rack สแตนเลส และปิดฝาหลอดแบบหลวมไว้ เพื่อสำหรับใส่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา หลังผ่านการทำให้ปราศจาก การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำ Rack ใส่ในถุงร้อนขนาดกว้าง 20 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว และมัดยาง ปิดถุงร้อนให้สนิท ตามด้วยการติด Autoclave tape บริเวณใดบริเวณหนึ่งของถุงร้อน

7. นำขวดอาหารในข้อ 5 และหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิดในข้อ 6 วางลงในเครื่อง Autoclave เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. เมื่อเครื่อง Autoclave ทำงานเสร็จเรียบร้อยแล้ว และปรากฏหน้าจอแสดงอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส ให้ผู้ปฏิบัติงานกดปุ่ม Stop ตรงบริเวณแถบคำสั่งของเครื่อง Autoclave และหมุนเปิดฝา เพื่อนำหลอดแก้วเกลียวและขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราออกจากเครื่อง Autoclave

9. วางหลอดแก้วเกลียวและขวดอาหารในตู้ BSC class 2 รองจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิด Chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml ด้วย Auto pipette โดยใช้ปริมาตรยาตามสัดส่วนของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งสัดส่วนในการใช้ยา Chloramphenicol ต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA นั้น สามารถปฏิบัติได้ดังตารางที่ 2 หรือคำนวณยา Chloramphenicol ให้พร้อมใช้งานที่ความเข้มข้น 50 µg/ml ตามสัดส่วนของอาหาร SDA ได้จากสูตรในแผนภาพที่ 4

10. หลังจากที่ได้เติมยา Chloramphenicol ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราเรียบร้อยแล้ว ให้พลิกกลับขวดขึ้นลง ประมาณ 3-5 ครั้ง เพื่อให้ยากระจายตัวได้อย่างทั่วถึงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

11. เปิดอาหารที่มียา Chloramphenicol ลงในหลอดแก้วเกลียวด้วย Pipette controller ผ่าน Serological pipette ปริมาตรหลอดละ 6 มิลลิลิตร และวางเอียง (Slant) ให้มีสัดส่วน 3 ใน 4 ส่วนของหลอดอาหาร ดังภาพที่ 3

12. เมื่ออาหารแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ดังภาพที่ 4 เขียนระบุคำว่า SC ที่บริเวณด้านข้างของหลอดแก้ว เพื่อระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งานครั้งถัดไป

ตารางที่ 2 สัดส่วนปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราร่วมกับปริมาตรของยา Chloramphenicol

ปริมาตรอาหาร SDA (มิลลิลิตร)	ปริมาตรยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 50 mg/ml ให้พร้อมใช้งานที่ความเข้มข้น 50 µg/ml (ไมโครลิตร)
100	100
200	200
300	300
400	400
500	500
600	600
700	700
800	800
900	900
1,000	1,000

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้น Stock ยา Chloramphenicol 50 mg/ml

V_1 = ปริมาตร Stock ยา Chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml

C_2 = ความเข้มข้นของยา Chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

V_2 = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA

ตัวอย่างเช่น เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้มียา Chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml จาก Stock ยา Chloramphenicol 50 mg/ml สามารถเตรียมได้จากสมการดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50 \text{ mg/ml} \times V_1 = 50 \text{ µg/ml} \times 200 \text{ ml}$$

$$50000 \text{ µg/ml} \times V_1 = 50 \text{ µg/ml} \times 200 \text{ ml}$$

$$50000 \times V_1 = 10000 \text{ ml}$$

$$= 0.2 \text{ ml หรือ } 200 \text{ µl (ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 200 ml)}$$

ดังนั้น ใช้ยา Chloramphenicol ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อให้ยามีความเข้มข้น 50 µg/ml ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราปริมาณ 200 มิลลิลิตร

แผนภาพที่ 4 สูตรการคำนวณความเข้มข้นจาก Stock ยา Chloramphenicol 50 mg/ml ให้มีความเข้มข้นที่ 50 µg/ml ต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA

3.4.4.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC ชนิดหลอด

1. กดปุ่มเปิดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รอจนเครื่องชั่งปรากฏหน้าจอบอกปริมาณ จากนั้นวางจานชั่งสารเคมีลงที่จานชั่งสารของเครื่องชั่ง และกดปุ่ม tare เพื่อให้เครื่องชั่งหักปริมาณน้ำหนักของกระดาดชั่งสารเคมีออก รอจนเครื่องชั่งขึ้นปริมาณเป็น 0 กรัม

2. ใช้ช้อนตักสารเคมี ตวงผงอาหารลงในจานชั่งสารเคมีที่อยู่บนเครื่องชั่ง จนกว่าจะได้ตามปริมาณที่คำนวณไว้

3. เทผงอาหารตามปริมาณที่ชั่งได้ ลงในขวดดูแรน และตวงปริมาตรของน้ำกลั่นด้วยกระบอกตวง จากนั้นเทน้ำกลั่นที่ผ่านการตวงปริมาตรลงในขวดดูแรนที่มีผงอาหาร ซึ่งในระหว่างที่ผู้ปฏิบัติงานเทน้ำกลั่นลงในขวดดูแรนนั้น ให้ผู้ปฏิบัติงานเขย่าขวดอาหารเบา ๆ เพื่อให้อาหารเกิดการกระจายตัว

4. ปิดปากขวดดูแรนให้สนิท และเขย่าขวดประมาณ 7-10 ครั้ง เพื่อให้ผงอาหารกระจายตัว และป้องกันการจับกันเป็นก้อนของผงอาหารภายในขวด

5. คลายฝาเกลียวของขวดดูแรนลงเล็กน้อย และห่อปิดบริเวณฝาขวดดูแรนด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์และตามด้วยการติด Autoclave tape จากนั้นเขียนระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ที่บริเวณข้างขวด

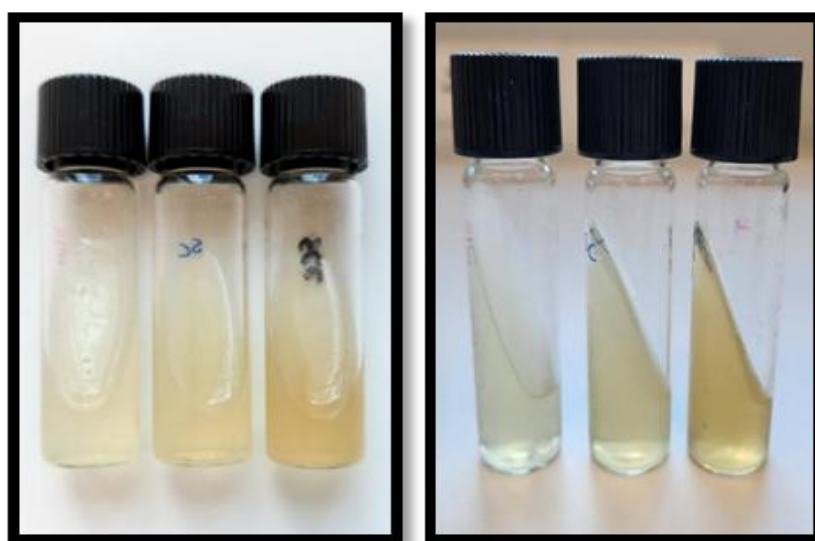
6. นำหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิด ขนาด 18x75 มิลลิเมตร เรียงลงใน Rack สแตนเลส และปิดฝาหลอดแบบหลวมไว้ เพื่อสำหรับใส่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา หลังผ่านการทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำ Rack ใส่ในตู้อบร้อนขนาดกว้าง 20 นิ้ว ยาว 28 นิ้ว และมีด้ายปิดตู้อบร้อนให้สนิท ตามด้วยการติด Autoclave tape บริเวณใดบริเวณหนึ่งของตู้อบร้อน

7. นำขวดอาหารในข้อ 5 และหลอดแก้วฝาเกลียวชนิดมีฝาปิดในข้อ 6 วางลงในเครื่อง Autoclave เพื่อทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. เมื่อเครื่อง Autoclave ทำงานเสร็จเรียบร้อยแล้ว และปรากฏหน้าจอแสดงอุณหภูมิเป็น 80 องศาเซลเซียส ให้ผู้ปฏิบัติงานกดปุ่ม Stop ตรงบริเวณแถบคำสั่งของเครื่อง Autoclave และหมุนเปิดฝาเพื่อนำหลอดฝาเกลียวและขวดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราออกจากเครื่อง Autoclave

9. วางหลอดฝาเกลียวและขวดอาหารในตู้ BSC class 2 รองอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตอาหารด้วย Pipette controller ผ่าน Serological pipette ลงในหลอดฝาเกลียวให้มีปริมาตรหลอดละ 6 มิลลิลิตร และวางเอียง (Slant) ให้มีสัดส่วน 3 ใน 4 ส่วนของหลอดอาหาร ดังภาพที่ 3

10. เมื่ออาหารแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ดังภาพที่ 4 เขียนระบุคำว่า SCC ที่บริเวณด้านข้างของหลอดแก้ว เพื่อระบุชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งานครั้งถัดไป



ภาพที่ 4 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดหลอด ได้แก่ SDA SC และ SCC ที่แข็งตัวเรียบร้อยแล้ว และพร้อมใช้งานสำหรับการเพาะเลี้ยงส่งตรวจจากผู้ป่วย

3.5 การรับส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การรับส่งตรวจของผู้ป่วยเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนแรกของผู้ปฏิบัติงาน ต้องตรวจสอบข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการส่งตรวจให้ตรงกันก่อนการเพาะเลี้ยง เพื่อไม่ให้เกิดข้อผิดพลาดเกี่ยวกับผลการตรวจวินิจฉัย ป้องกันการออกผลที่ผิดพลาด และการออกผลทางห้องปฏิบัติการเป็นไปได้อย่างถูกต้อง ส่งผลให้ทีมแพทย์สามารถรักษาผู้ป่วยได้รวดเร็ว และแม่นยำ ซึ่งขั้นตอนในการรับส่งตรวจมีดังนี้

3.5.1 ตรวจสอบข้อมูลรายละเอียดในใบส่งตรวจ ได้แก่ ชื่อ-นามสกุลผู้ป่วย เลข Hospital number เลข Lab number วันเวลาที่เก็บส่งตรวจ วันเวลาที่ส่งตรวจ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ และรหัสการส่งตรวจ ซึ่งรหัสที่ทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราใช้นั้น เป็นรายการตรวจ Culture for fungus (2206)

3.5.2 ตรวจสอบสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่นำส่งมาพร้อมกับใบส่งตรวจ โดยภาชนะที่ใส่ส่งส่งตรวจมานั้น ต้องอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ปิดสนิท ไม่เกิดการรั่วไหลออกนอกภาชนะบรรจุและไม่มีการแตกหักของภาชนะบรรจุ ซึ่งสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำล้างปอด หนอง น้ำจากช่องท้อง หรือของเหลวตามอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย สิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อ และสิ่งส่งตรวจที่เป็นผิวหนัง ขน ผม เล็บ จะบรรจุมาในกระป๋องปากกว้างที่ปราศจากเชื้อฝาเขียว ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำจากไขสันหลังจะบรรจุมาในขวดแก้วฝาปิดที่ปราศจากเชื้อ และสิ่งส่งตรวจที่เป็นกระจกตาของผู้ป่วย จะส่งมายังห้องปฏิบัติการในรูปแบบของเพลท SDA ที่มีการนำกระจกตาของผู้ป่วยเพาะเลี้ยงมาบนเพลทเรียบร้อยแล้ว โดยผู้ปฏิบัติงานนั้นจะต้องตรวจสอบสต็อกเกอร์บาร์โค้ดผู้ป่วยที่ติดมากับตัวอย่างว่าอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ไม่เกิดการเลือนราง หรือจางหายไป และต้องเป็นข้อมูลที่ตรงกับรายละเอียดในใบส่งตรวจ

3.5.3 เมื่อผู้ปฏิบัติงานตรวจสอบข้อมูลการส่งตรวจ ตรวจสอบตัวอย่างที่ส่งมาพร้อมใบส่งตรวจเรียบร้อยแล้ว โดยทั้งสองต้องให้ข้อมูลรายละเอียดทุกอย่างที่ตรงกัน จากนั้นผู้ปฏิบัติงานเช็คข้อมูลการส่งตรวจอีกครั้งผ่านทางหน้าโปรแกรม E-phis ของทางโรงพยาบาลวชิรพยาบาล

3.5.4 เมื่อผู้ปฏิบัติงานตรวจสอบข้อมูลการส่งตรวจทางระบบโปรแกรม E-phis เรียบร้อยแล้ว ให้กดรับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจดังกล่าว และปรีนสต็อกเกอร์บาร์โค้ดของผู้ป่วยจำนวน 4 ใบ พร้อมปรีนใบส่งตรวจจำนวน 1 ใบ เพื่อระบุลงในแบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังภาคผนวก ก

3.5.5 เขียนเลขระดับลำดับของผู้ป่วยบนสต็อกเกอร์ทั้ง 4 ใบ ให้ตรงกับลำดับในแบบฟอร์มของทางห้องปฏิบัติการ โดยนำสต็อกเกอร์ใบแรกติดที่แบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังภาคผนวก ก สต็อกเกอร์ใบที่ 2 ติดที่หลอด SDA สต็อกเกอร์ใบที่ 3 ติดที่หลอด SC และสต็อกเกอร์ใบที่ 4 ไว้สำหรับติดสไลด์จากสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการย้อมแกรมการสีการส่งตรวจตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อจากภายนอกร่างกาย เช่น ขน ผม และ เล็บ สต็อกเกอร์ใบแรกจะติดที่แบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังภาคผนวก ก สต็อกเกอร์ใบที่ 2 ติดที่หลอด SDA สต็อกเกอร์ใบที่ 3 ติดที่หลอด SC และสต็อกเกอร์ใบที่ 4 ไว้สำหรับติดที่หลอด SCC และในกรณีที่ส่งตรวจในรูปแบบของเพลท SDA จากกระจกตาของผู้ป่วย ปรีนสต็อกเกอร์บาร์โค้ดของผู้ป่วยจำนวน 2 ใบเท่านั้น สำหรับติดที่เพลทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และติดในเอกสารแบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังภาคผนวก ก

3.6 การเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหลอด

การนำสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหลอดนั้น เป็นขั้นตอนที่สำคัญซึ่งต้องปฏิบัติงานภายในตู้ BSC Class 2 เท่านั้น เพื่อให้สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อยู่ในสภาพแวดล้อม ส่งผลให้ผลการวินิจฉัยโรคเป็นไปได้อย่างถูกต้อง ลดข้อผิดพลาดในการรายงานผลทางห้องปฏิบัติการ และส่งผลให้ทีมแพทย์สามารถรักษาโรคได้อย่างแม่นยำ รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มความปลอดภัยในระหว่างการปฏิบัติงาน และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อต่าง ๆ สู่ชุมชนและสภาพแวดล้อม

3.6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลว ได้แก่ น้ำล้างปอด น้ำจากไขสันหลัง หนอง น้ำจากช่องท้อง หรือของเหลวจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย จะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และ SC และย้อมแกรมจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อราของผู้ป่วยในระดับเบื้องต้น โดยมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อราดังนี้

1. เมื่อผู้ปฏิบัติงานเขียนเลขระบุลำดับของผู้ป่วยบนสติ๊กเกอร์ทั้ง 4 ใบ ให้ตรงกับลำดับในแบบฟอร์มของทางห้องปฏิบัติการเรียบร้อยแล้ว โดยนำสติ๊กเกอร์ใบแรกติดที่แบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังกล่าว ก สติ๊กเกอร์ใบที่ 2 ติดที่หลอด SDA สติ๊กเกอร์ใบที่ 3 ติดที่หลอด SC และสติ๊กเกอร์ใบที่ 4 ไว้สำหรับติดสไลด์จากสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการย้อมแกรม จากนั้นปฏิบัติงานในข้อที่ 2-6 ภายในตู้ BSC Class 2

2. ให้ผู้ปฏิบัติงานคลายเกลียวฝาหลอดอาหาร SDA และ SC ลงเล็กน้อย จากนั้นจุดไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ และคลายเกลียวฝาที่ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจลงเล็กน้อย

3. นำ Sterile pasteur pipette ออกจากถุงบรรจุ และปิเปตสิ่งส่งตรวจของเหลวจากภาชนะบรรจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4. ให้ผู้ปฏิบัติงานเปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และหยดตัวอย่างของผู้ป่วยลงในหลอด SDA ประมาณ 3-4 หยด โดยให้สิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลวไหลผ่านผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราจากบริเวณบนสุดไปยังบริเวณปลายหลอด และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

5. ให้ผู้ปฏิบัติงานเปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟ 5 ครั้ง เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และหยดตัวอย่างของผู้ป่วยลงในหลอด SC ประมาณ 3-4 หยด โดยให้สิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลวไหลผ่านผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราจากบริเวณบนสุดไปยังบริเวณปลายหลอด และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

6. หยดสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เหลือใน Sterile pasteur pipette ลงบนแผ่นสไลด์ ทำการ Smear สิ่งส่งตรวจบนแผ่นสไลด์ ตากให้แห้งสนิท และนำไปผ่านเปลวไฟ จำนวน 3-4 วินาที เพื่อตรึงสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยบนแผ่นสไลด์

7. นำหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และ SC ที่มีตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่ออ่านผลตามรอบของทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อไป

8. นำแผ่นสไลด์สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยจากข้อ 6 ไปย้อมแกรม เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อราของผู้ป่วยในระดับเบื้องต้น โดยหยด Crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยด Iodine ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา และหยดด้วย 95% alcohol ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 วินาที และล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยดด้วย Safanin O ลงบนสไลด์ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา และซับแผ่นสไลด์สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ผ่านการย้อมแกรมให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ติดสติ๊กเกอร์ใบที่ 4 บนแผ่นสไลด์ และนำสไลด์ไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

3.6.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อ จะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และ SC และย้อมแกรมจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อราของผู้ป่วยในระดับเบื้องต้น โดยมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อราดังนี้

1. เมื่อผู้ปฏิบัติงานเขียนเลขระบุลำดับของผู้ป่วยบนสติ๊กเกอร์ทั้ง 4 ใบ ให้ตรงกับลำดับในแบบฟอร์มของทางห้องปฏิบัติการเรียบร้อยแล้ว โดยนำสติ๊กเกอร์ใบแรกติดที่แบบฟอร์มของทางห้องปฏิบัติการดังกล่าว ภาคผนวก ก สติ๊กเกอร์ใบที่ 2 ติดที่หลอด SDA สติ๊กเกอร์ใบที่ 3 ติดที่หลอด SC และสติ๊กเกอร์ใบที่ 4 ไว้สำหรับติดสไลด์จากสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการย้อมแกรม จากนั้นปฏิบัติงานในข้อที่ 2-8 ภายในตู้ BSC Class 2

2. ให้ผู้ปฏิบัติงานคลายเกลียวฝาหลอดอาหาร SDA และ SC ลงเล็กน้อย จากนั้นจุดไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ และคลายเกลียวฝาที่ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจลงเล็กน้อย

3. นำ Sterile pasteur pipette ออกจากถุงบรรจุ และบีบเปิดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในโถงที่ปราศจากเชื้อ

4. นำชิ้นเนื้อออกจากภาชนะบรรจุ ด้วย Sterile forceps และใส่ลงในโถงที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในข้อ 3 กรณีที่ชิ้นเนื้อมีขนาดใหญ่ให้ตัดชิ้นเนื้อด้วยกรรไกรตัดชิ้นเนื้อที่ปราศจากเชื้อ เพื่อให้ชิ้นเนื้อมีขนาดเล็กประมาณ 5 มิลลิเมตร

5. บดชิ้นเนื้อด้วยลูกบิดจนกว่าชิ้นเนื้อจะมีขนาดเล็ก หรือละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำกลั่น และบีบเปิดสิ่งส่งตรวจทั้งหมดด้วย Sterile pasteur pipette

6. ให้ผู้ปฏิบัติงานเปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และหยดตัวอย่างของผู้ป่วยผ่านการบดลงในหลอด SDA ประมาณ 3-4 หยด โดยให้สิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลวไหลผ่านผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา จากบริเวณบนสุดไปยังบริเวณปลายหลอด หากยังเหลือชิ้นเนื้อขนาดเล็กในโถง ให้นำชิ้นเนื้อใส่ในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วย Sterile forceps และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อทำให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

7. ให้ผู้ปฏิบัติงานเปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และหยดตัวอย่างของผู้ป่วยลงในหลอด SC ประมาณ 3-4 หยด โดยให้สิ่งส่งตรวจที่เป็นของเหลวไหลผ่านผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราจากบริเวณบนสุดไปยังบริเวณปลายหลอด หากยังเหลือชิ้นเนื้อขนาดเล็กในโกร่ง ให้นำชิ้นเนื้อใส่ในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วย Sterile forceps และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้งเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

8. หยดสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เหลือใน Sterile pasteur pipette ลงบนแผ่นสไลด์ ทำการ smear สิ่งส่งตรวจบนแผ่นสไลด์ ตากให้แห้งสนิท จากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ จำนวน 3-4 วินาที เพื่อตรึงสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยบนแผ่นสไลด์ แต่หากสิ่งส่งตรวจไม่สามารถนำมาย้อมแกรมได้ให้ผู้ปฏิบัติงานลดขั้นตอนในการย้อมแกรมจากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย

9. นำหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และ SC ที่มีตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่ออ่านผลตามรอบของทางห้องปฏิบัติการต่อไป

10. นำแผ่นสไลด์สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยจากข้อ 8 ไปย้อมแกรม เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อราของผู้ป่วยในระดับเบื้องต้น โดยหยด Crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยด Iodine ให้ทั่วบริเวณรอย smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา และหยดด้วย 95% alcohol ให้ทั่วบริเวณรอย smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 วินาที และล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยดด้วย Safanin O ลงบนสไลด์ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา และซับแผ่นสไลด์สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่ผ่านการย้อมแกรมให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ติดสติกเกอร์ใบที่ 4 บนแผ่นสไลด์ และนำสไลด์ไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

3.6.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นผิวหนัง ได้แก่ ขน ผม เล็บ จะเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC โดยมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อราดังนี้

1. เมื่อผู้ปฏิบัติงานเขียนเลขระบุลำดับของผู้ป่วยบนสติกเกอร์ทั้ง 4 ใบ ให้ตรงกับลำดับในแบบฟอร์มของทางห้องปฏิบัติการเรียบร้อยแล้ว โดยนำสติกเกอร์ใบแรกติดที่แบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังกล่าว ก สติกเกอร์ใบที่ 2 ติดที่หลอด SDA สติกเกอร์ใบที่ 3 ติดที่หลอด SC และสติกเกอร์ใบที่ 4 ติดที่หลอด SCC และปฏิบัติงานในข้อที่ 2-5 ภายในตู้ BSC Class 2

2. ให้ผู้ปฏิบัติงานคลายเกลียวฝาหลอดอาหาร SDA, SC และ SCC ลงเล็กน้อย จากนั้นจุดไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ และคลายเกลียวฝาที่ภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจลงเล็กน้อย

3. ให้ผู้ปฏิบัติงานเปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และนำชิ้นเนื้อออกจากถุงบรรจุด้วย Sterile forceps ใส่ชิ้นเนื้อมัดลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA โดยการวางสิ่งส่งตรวจลงบนผิวหน้าของอาหาร และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

4. เปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และนำชิ้นเนื้อออกจากถุงบรรจุด้วย Sterile forceps ใส่ชิ้นเนื้อมัดลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC โดยการวางสิ่งส่งตรวจลงบนผิวหน้าของอาหาร และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

5. เปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC โดยนำบริเวณปากหลอดอาหารไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และนำชิ้นเนื้อออกจากถุงบรรจุด้วย Sterile forceps ใส่ชิ้นเนื้อมัดลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC โดยการวางสิ่งส่งตรวจลงบนผิวหน้าของอาหาร และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC ไปผ่านเปลวไฟอีกครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และปิดฝาหลอดให้สนิท

6. นำหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SC และหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SCC ที่มีตัวอย่างสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยเรียบร้อยแล้ว ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่ออ่านผลตามรอบของทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อไป

3.6.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเพลท SDA

สำหรับการเพาะเลี้ยงส่งตรวจผู้ป่วยที่ส่งตรวจมาในรูปแบบเพลท SDA นั้น ทีมแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างจากกระเจตาของผู้ป่วย และเพาะเลี้ยงลงบนเพลทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA ได้โดยตรง โดยผู้ปฏิบัติงานจะตรวจสอบข้อมูลรายละเอียดการส่งตรวจในใบส่งตรวจ และตรวจสอบสต็อกเกอร์ที่ติดมากับเพลทให้ตรงกัน จากนั้นให้กดรับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจดังกล่าว และปรีนสต็อกเกอร์บาร์โค้ดของผู้ป่วยจำนวน 2 ใบ สำหรับติดที่เพลทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA และติดในเอกสารแบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการดังกล่าว ก พร้อมปรีนใบส่งตรวจจำนวน 1 ใบ และนำเพลทไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่ออ่านผลตามรอบของทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อไป

3.7 การอ่านผลจากหลอดเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจ และวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ

การอ่านผลทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ผู้ปฏิบัติงานและอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญจะอ่านผลทุกวันจันทร์ และวันพฤหัสบดี ด้วยการอ่านผลจากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจ และบันทึกผลลงในแบบฟอร์ม ดังภาคผนวก ก สำหรับหลอดอาหารที่พบการเจริญเติบโตของโคโลนี ผู้ปฏิบัติงานจะนำโคโลนีเชื้อมาใส่ลงในขวดไปย้อมแกรมเพื่อแยกแยะระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ หากพบการเจริญเติบโตของยีสต์ จะเพิ่มจำนวนบนเพลท SDA และวิเคราะห์ผลด้วยเทคโนโลยี MALDI- TOF MS แต่หากพบการเจริญเติบโตของราสายจะเพิ่มจำนวนบนเพลท SDA และย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue จากนั้นอ่านผลโครงสร้างของราสายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญที่รับผิดชอบการตรวจ

3.7.1 หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่พบการเจริญเติบโตของโคโลนีนั้น จะแยกแยะเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ด้วยการย้อมแกรมจากโคโลนี ซึ่งต้องปฏิบัติงานในตู้ BSC class 2 เท่านั้น โดยมีขั้นตอนรายละเอียดดังนี้

3.7.1.1 ปิเปตน้ำกลั่นด้วย Pasteur pipette และหยดลงบน Glass slide ประมาณ 1 หยด

3.7.1.2 จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่พบการเจริญเติบโตของโคโลนี และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ๆ

3.7.1.3 เชี่ยวโคโลนีด้วย Sterile loop และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไปผ่านเปลวไฟอีกครั้งเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ๆ และปิดฝาหลอดให้สนิท จากนั้น smear เชื้อลงบน Glass slide ที่หยดน้ำกลั่นไว้

3.7.1.4 ตาก Glass slide จนกว่าบริเวณรอย Smear แห้งสนิท และนำแผ่นสไลด์ไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 3-4 วินาที เพื่อตรึงเชื้อบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ออกจาก BSC class 2 เพื่อไปย้อมแกรม

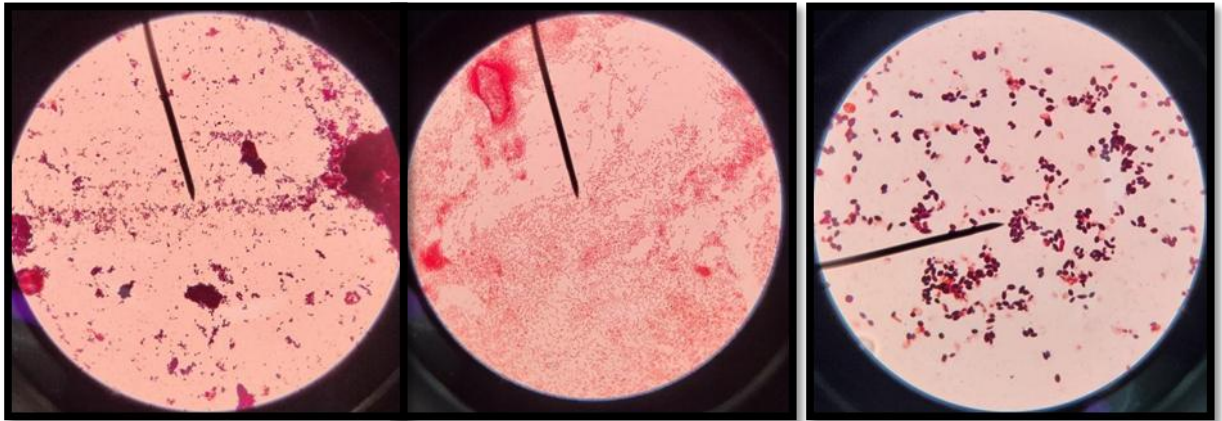
3.7.1.5 หยด Crystal violet ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปา

3.7.1.6 หยด Iodine ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำประปา

3.7.1.7 หยดด้วย 95% alcohol ให้ทั่วบริเวณรอย Smear ของสิ่งส่งตรวจ ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 วินาที และล้างออกด้วยน้ำประปา

3.7.1.8 หยดด้วย Safanin O ลงบนสไลด์ให้ทั่วบริเวณ Smear ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา และซับแผ่นสไลด์ที่ผ่านการย้อมแกรมให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู

3.7.1.9 อ่านผลสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า จะเห็นลักษณะการติดสีดังภาพที่ 5 โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีการย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet หรือสีแดงของ Safanin และมีรูปร่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลีวย ท่อน และกลม มีความกว้างประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 2-5 ไมโครเมตร ส่วนยีสต์นั้นมีขนาดประมาณ 3-4 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่กว่าแบคทีเรีย และย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet เท่านั้น



ภาพ ก

ภาพ ข

ภาพที่ 5

ภาพ ก ลักษณะแบคทีเรียที่ผ่านการย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยเชื้อแบคทีเรียจะมีการย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet หรือสีแดงของ Safanin และมีรูปร่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เกลียว ท่อน กลม มีความกว้างประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 2-5 ไมโครเมตร

ภาพ ข ลักษณะยีสต์ที่ผ่านการย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยยีสต์นั้นมีขนาดประมาณ 3-4 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่กว่าแบคทีเรีย และย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet

3.7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์จากหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีสิ่งส่งตรวจ

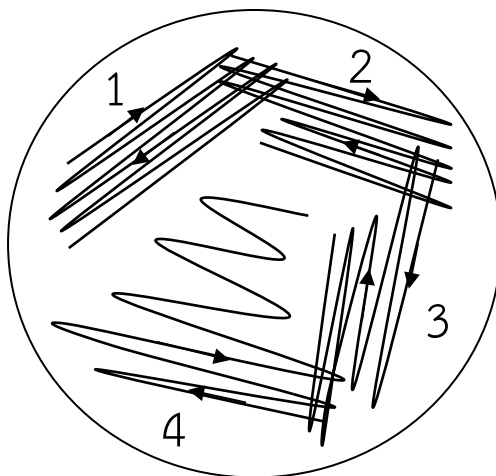
เมื่อผู้ปฏิบัติงานนำโคโลนีของเชื้อมาย้อมแกรมและอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากพบการเจริญเติบโตของยีสต์ จะเพิ่มจำนวนบนเพลท SDA เพื่อวิเคราะห์ผลด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS ในลำดับต่อไป ซึ่งขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์จากหลอดส่งตรวจต้องปฏิบัติงานในตู้ BSC class 2 โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.7.2.1 จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ เปิดฝาหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราที่พบการเจริญเติบโตของยีสต์ และนำไปผ่านเปลวไฟ เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ๆ

3.7.2.2 เชี่ยวโคโลนีด้วย Sterile loop และนำบริเวณปากหลอดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่น ๆ และปิดฝาหลอดให้สนิท

3.7.2.3 Streak เชื้อลงบนเพลท SDA ในระนาบที่ 1 และระนาบที่ 2 จากนั้นเปลี่ยน sterile loop เพื่อ Streak เชื้อในระนาบที่ 3 และ 4 ดังภาพที่ 6

3.7.2.4 นำเพลท SDA ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าเชื้อจะเจริญเติบโต



ภาพที่ 6 การ streak เชื้อลงบนเพลท SDA ในแต่ละระนาบ เพื่อแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวจำนวนมาก จากนั้นจึงนำโคโลนีเดี่ยวไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS

3.7.3 การเพาะเลี้ยงราสายจากหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีสิ่งส่งตรวจ

เมื่อผู้ปฏิบัติงานพบการเจริญเติบโตของราสาย ดังภาพที่ 7 จะเพิ่มจำนวนบนเพลท SDA เพื่อวิเคราะห์ผลด้วยสี Lacto phenol cotton blue ในลำดับต่อไป ซึ่งขั้นตอนการเพาะเลี้ยงราสายจากหลอดสิ่งส่งตรวจต้องปฏิบัติงานในตู้ BSC class 2 โดยมีขั้นตอนดังนี้

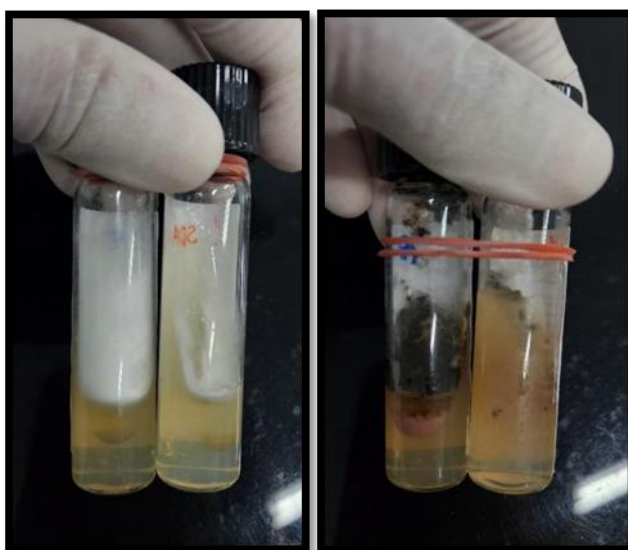
3.7.3.1 จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ และนำอุปกรณ์ที่ใช้เชื้อราสาย (Hook) ไปทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อ ด้วยการผ่านเปลวไฟให้เกิดความร้อนซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งสีแดง และนำด้ามจับเสียบใส่ใน Rack ไว้ เพื่อให้บริเวณที่ใช้เชื้อราสายระบายความร้อนจากเปลวไฟ

3.7.3.2 เปิดฝาหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่พบราสาย และนำไปผ่านเปลวไฟเป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อต่าง ๆ

3.7.3.3 เชื้อราสายด้วย Hook ลงบนเพลท SDA และนำบริเวณปากหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไปผ่านเปลวไฟ เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อต่าง ๆ และปิดฝาหลอดให้สนิท

3.7.3.4 นำอุปกรณ์ที่ใช้เชื้อราสาย (Hook) ไปทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออีกครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อราออกจาก Hook ด้วยการผ่านเปลวไฟจนกว่าจะเกิดเป็นแท่งสีแดง

3.7.3.5 เพาะเลี้ยงเพลท SDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าราสายเจริญเติบโตทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร SDA



ภาพที่ 7 ลักษณะของราสายที่เจริญเติบโตบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใย
เจริญเติบโตแผ่ออกรอบ ๆ บริเวณผิวหน้าของอาหาร

3.7.4 การวิเคราะห์ผลยีสต์ด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS

เทคโนโลยี Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) เป็นนวัตกรรมการตรวจวินิจฉัย เพื่อแยกชนิดของเชื้อทางห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องและรวดเร็วสูง โดยอาศัยเทคโนโลยีการจำแนก ลักษณะเฉพาะของมวลสารที่มีความแตกต่างกันของเชื้อแต่ละชนิด ทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคได้อย่างถูกต้อง ซึ่งทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราได้นำเทคโนโลยีชนิดนี้มาใช้เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วย ซึ่งการวิเคราะห์ผลยีสต์ด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS มีขั้นตอนการตรวจดังนี้

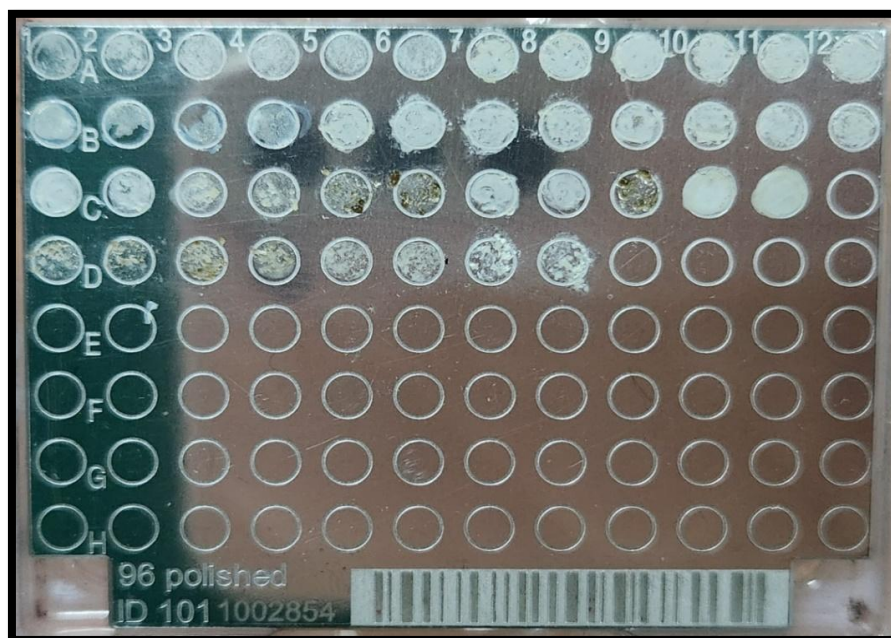
3.7.4.1 นำเพลทยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเชื้อ 37 องศาเซลเซียส จากข้อ 3.7.2 เข้าตู้ BSC class 2

3.7.4.2 เชื้อโคโลนีของยีสต์ด้วยไม้จิ้มฟัน sterile และ smear ยีสต์ลงในช่องที่ปรากฏบนตำแหน่งของแผ่น target ดังภาพที่ 8

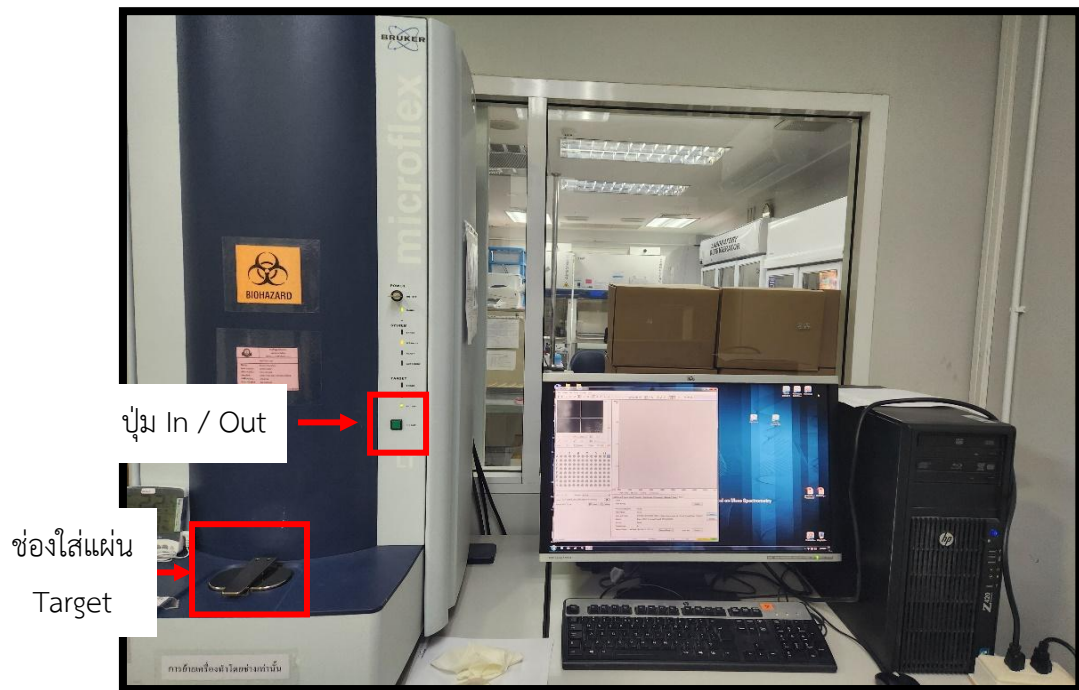
3.7.4.3 ปิเปต 70% formic acid ด้วย Auto pipette ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในช่องที่ smear ยีสต์ไว้ และวางทิ้งไว้จนแห้ง

3.7.4.4 เมื่อ 70% formic acid แห้งสนิทแล้ว ปิเปตสาร HCCA ด้วย Auto pipette ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในช่องที่ smear ยีสต์ไว้อีกครั้ง วางทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำแผ่น target ออกจากตู้ BSC class 2 เพื่อไปวิเคราะห์ผลเครื่อง MALDI-TOF MS

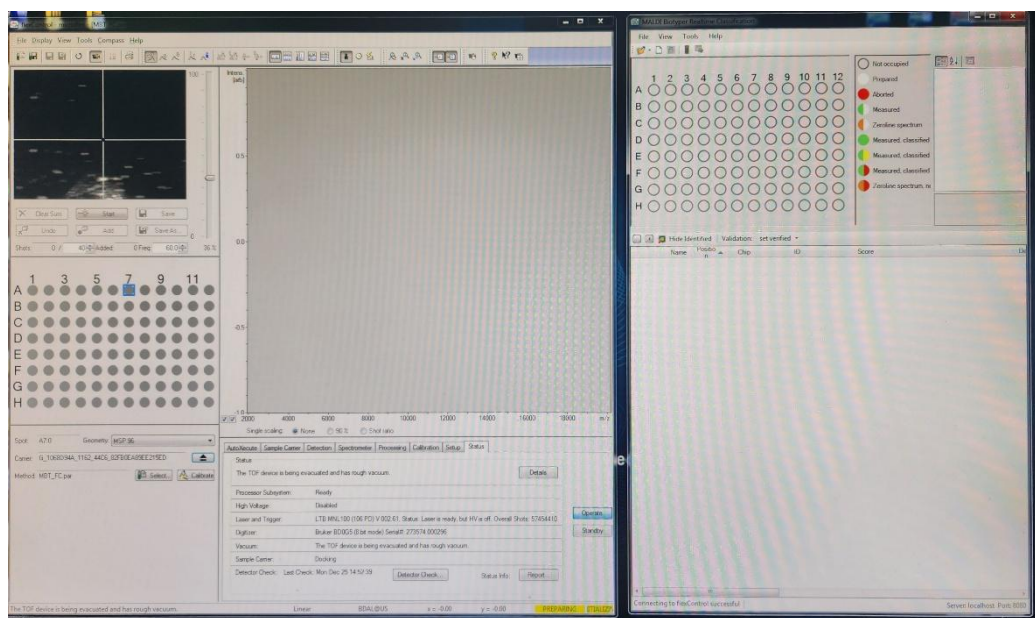
3.7.4.5 การวิเคราะห์ผลด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS หรือเครื่อง MALDI-TOF MS สามารถทำได้ด้วยการกดปุ่ม In / Out ที่เครื่อง MALDI-TOF ดังภาพที่ 9 เพื่อให้เครื่องปรับแรงดันบริเวณภายในเครื่อง และรอจนกว่าสัญญาณไฟจะกลับมาเป็นสีเขียวที่ช่อง ACCESS จากนั้นเปิดช่องใส่แผ่น target และวางแผ่น target ลงที่เครื่อง MALDI-TOF MS และกดปุ่ม In/Out อีกครั้ง รอจนสัญญาณไฟกลับมาเป็นสีเขียวที่ช่อง ACCESS จากนั้นใช้เมาส์คลิกเปิดใช้งานโปรแกรม flexControl และโปรแกรม MALDI Biotype RTC จะปรากฏหน้าต่างของทั้งสองโปรแกรมคู่กัน ดังภาพที่ 10 ให้ผู้ปฏิบัติงานใช้เมาส์คลิกคำว่า File เลือก New Classification ที่หน้าต่างของโปรแกรม MALDI Biotype RTC ดังภาพที่ 11 จะปรากฏหน้าต่างดังภาพที่ 12 ให้ผู้ปฏิบัติงานตั้งชื่อไฟล์งานตามที่ต้องการ และเมื่อผู้ปฏิบัติงานตั้งชื่อไฟล์งานเรียบร้อยแล้ว ให้คลิกที่คำว่า New ซึ่งครั้งนี้จะขึ้นแถบให้ใส่ชื่อไฟล์อีกครั้ง ผู้ปฏิบัติงานสามารถใส่ชื่อไฟล์ได้ตามที่ต้องการ ดังภาพที่ 13 และกดคำว่า OK ตามด้วยการกดที่คำว่า Next จะปรากฏให้เห็นหน้าต่าง ดังภาพที่ 14 ให้ผู้ปฏิบัติงานใช้เมาส์คลุมตำแหน่งของช่องที่มีการ Smear ยีสต์ บนแผ่น target และคลิกขวา จากนั้นให้กดคำว่า Add analysis และเมื่อหน้าจอปรากฏหน้าต่างดังภาพที่ 15 ให้กรอกข้อมูลตัวอย่างลงในช่อง ID และกดคำว่า Next และ Finish ตามลำดับ หลังจากนั้นเครื่อง MALDI-TOF MS จะทำการวิเคราะห์ผล และชนิดของเชื้อ ดังภาพที่ 16 เมื่อเครื่อง MALDI-TOF MS วิเคราะห์ผลเรียบร้อยแล้วจะปรากฏชนิดของเชื้อดังภาพที่ 17 ให้ผู้ปฏิบัติงานปริ้นผลการวิเคราะห์ และให้อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทำการออกผลทางห้องปฏิบัติการต่อไป



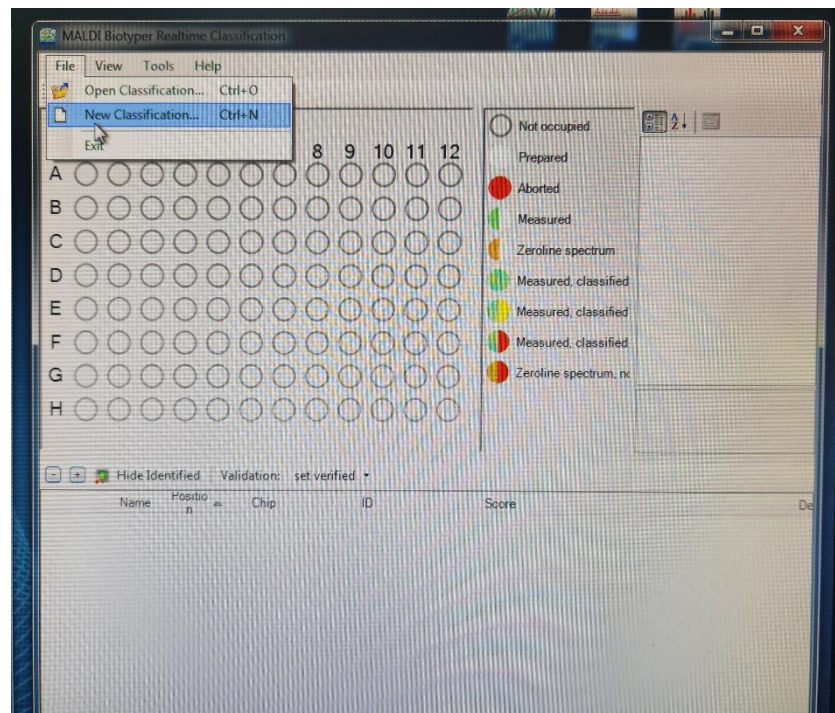
ภาพที่ 8 ลักษณะของแผ่น Target ที่ใช้ในการ Smear โคโลนีของยีสต์ลงในแต่ละช่องกลม เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลยีสต์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS



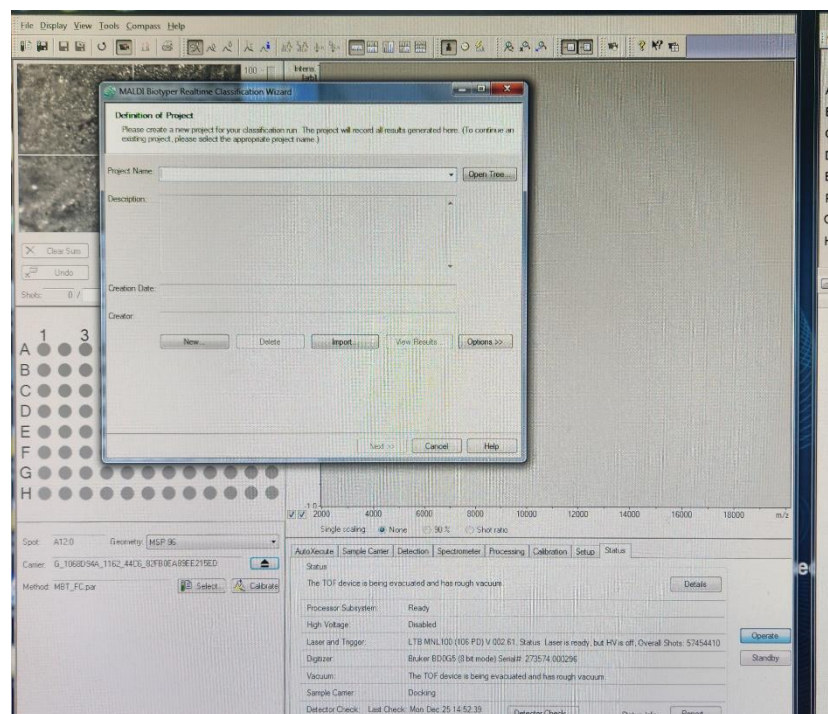
ภาพที่ 9 ตำแหน่งปั๊มกดต่าง ๆ ของเครื่อง MALDI-TOF MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลยีสต์



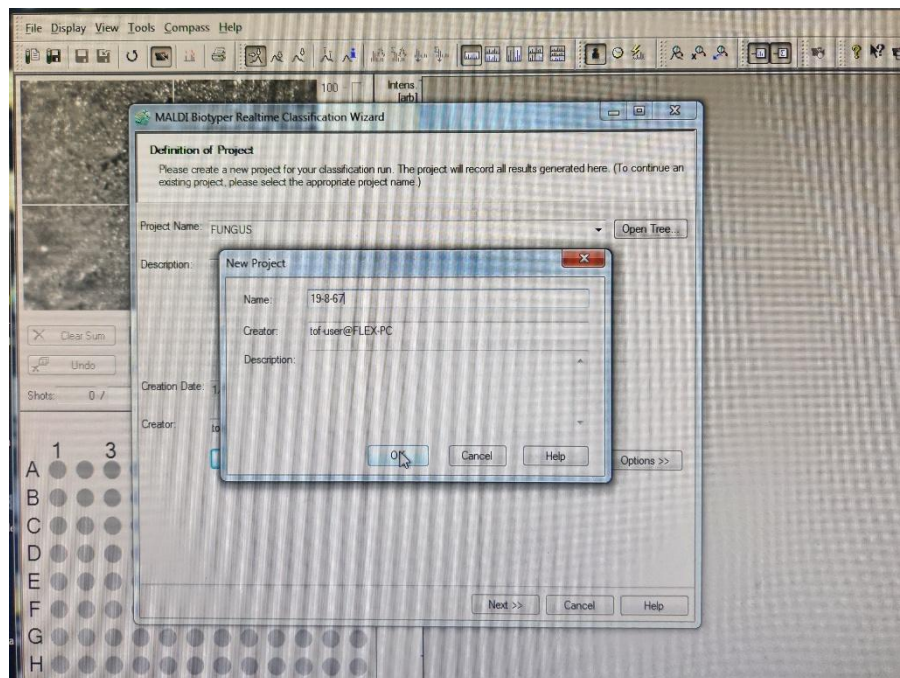
ภาพที่ 10 หน้าต่างของโปรแกรม flexControl และ โปรแกรม MALDI Biotype RTC



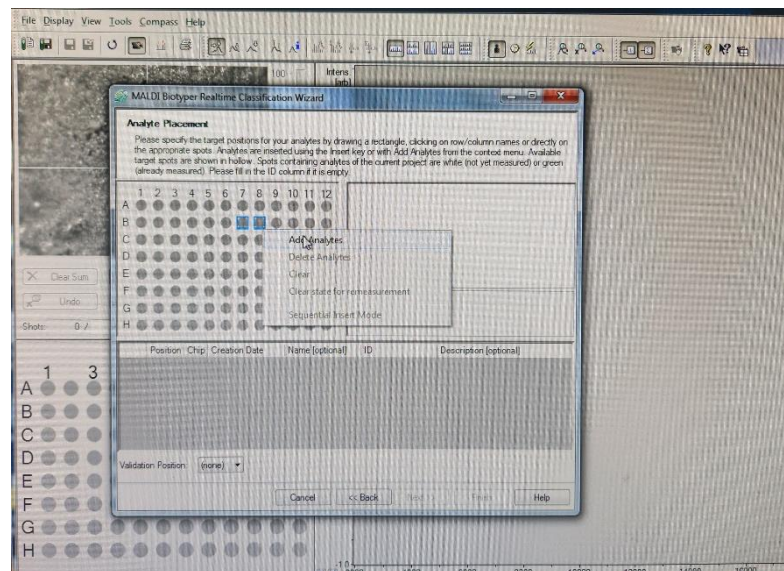
ภาพที่ 11 การสร้างไฟล์งานที่หน้าต่างของโปรแกรม MALDI Biotyper RTC



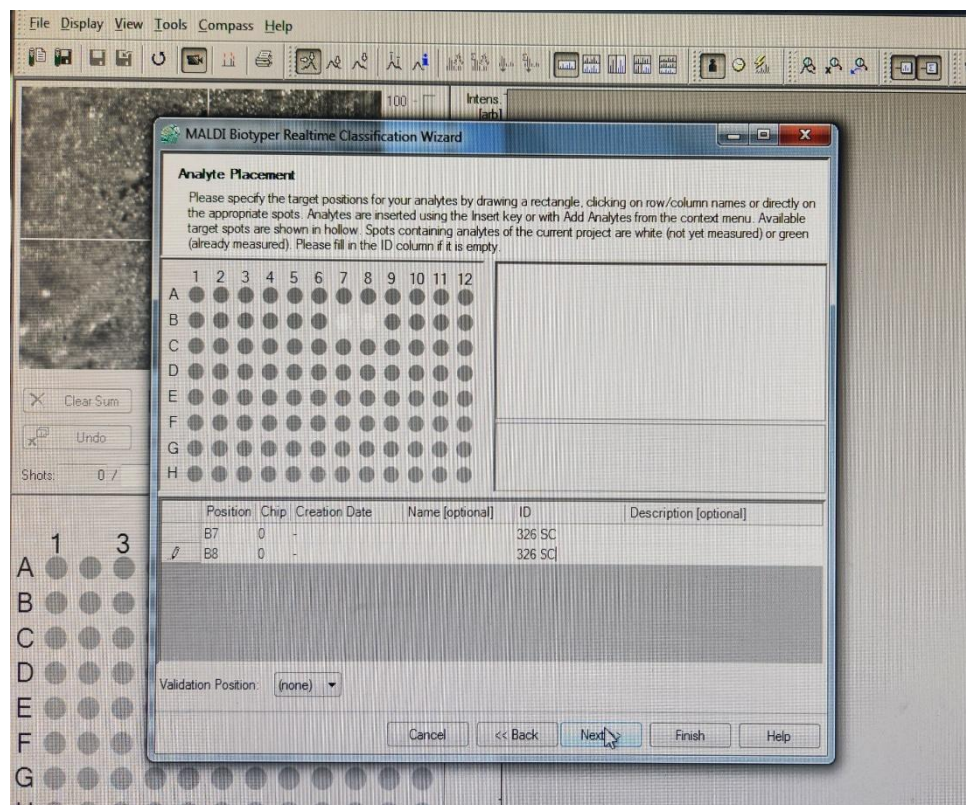
ภาพที่ 12 การใส่ชื่อไฟล์งานที่ทำการวิเคราะห์ผล



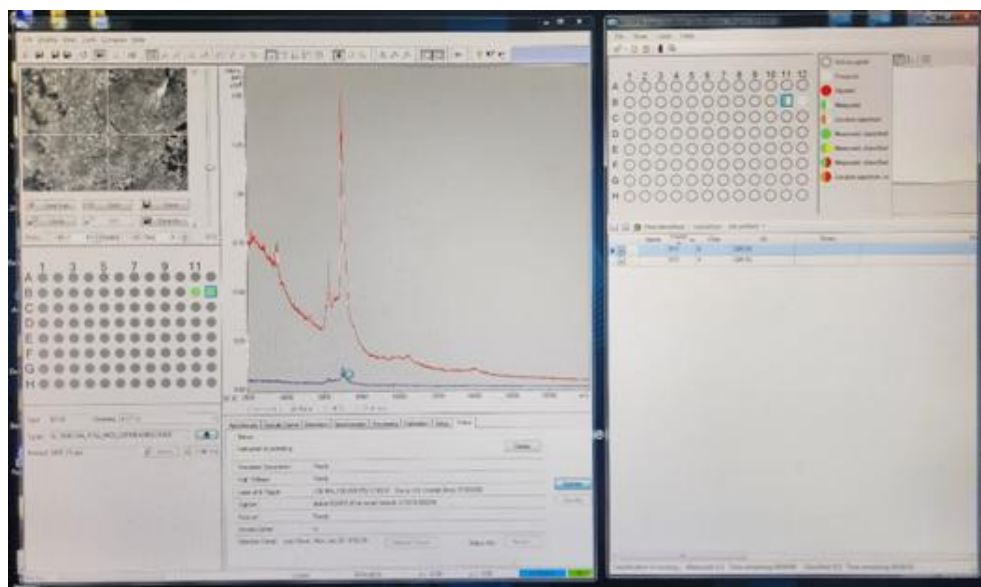
ภาพที่ 13 การใช้ชื่อผู้ปฏิบัติงาน (ผู้ปฏิบัติงานเลือกใส่เป็นวันเดือนปีทีวิเคราะห์ผลยีสต์)



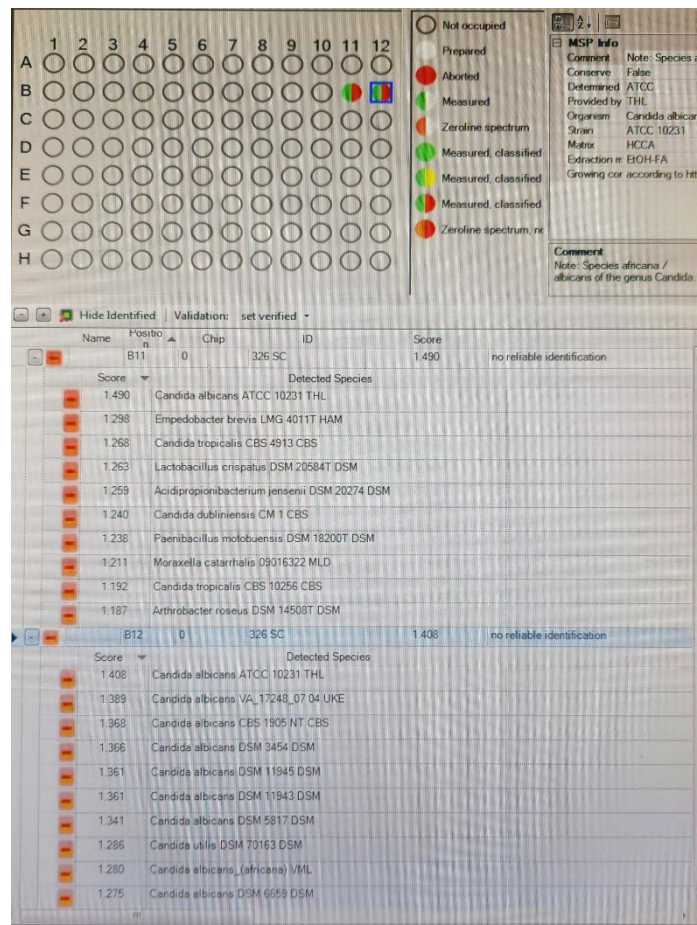
ภาพที่ 14 หน้าต่างแสดงขั้นตอนการใส่ชื่อในช่องตัวอย่างเชื่อมตามตำแหน่งจริงของแผ่น Target



ภาพที่ 15 หน้าต่างแสดงการระบุชื่อของตัวอย่างเชื้อตามตำแหน่งจริงของแผ่น Target



ภาพที่ 16 การทำงานของเครื่อง MALDI-TOF MS ในระหว่างวิเคราะห์ผลที่ตำแหน่ง B11-B12



ภาพที่ 17 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ในตำแหน่ง B11-B12

3.7.5 การอ่านผลราสายด้วยการย้อมสี Lacto phenol cotton blue

Lacto phenol cotton blue หรือสารที่มีสีน้ำเงิน เป็นสีสำหรับใช้ย้อมราสาย เพื่อศึกษา ลักษณะของโคนิเดีย ลักษณะของเส้นใย และโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการอ่านผลราสายด้วยการย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue ของทางห้องปฏิบัติการ เพาะเลี้ยงเชื้อรานั้น เป็นการนำเพลท SDA ของราสายที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากข้อ 3.7.3 มาย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue และต้องปฏิบัติงานภายในตู้ BSC class 2 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ปิเปตสี Lacto phenol cotton blue ด้วย Sterile pasture pipette ลงบน Glass slide จำนวน 3 หยด
2. จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ และนำอุปกรณ์ที่ใช้เชี่ยราสาย (Hook) ไปทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อ ด้วยการผ่านเปลวไฟจนกว่าจะเกิดเป็นแท่งสีแดง และนำด้ามจับเสียบใส่ใน Rack ไว้ เพื่อให้บริเวณที่ใช้เชี่ยราสายระบายความร้อนจากเปลวไฟ
3. เชี่ยราสายด้วย Hook จากเพลท SDA และนำไปเชี่ยให้กระจายลงบนแผ่นสไลด์ที่มีสี Lacto phenol cotton blue และปิดด้วยแผ่น Cover slip
4. นำอุปกรณ์ที่ใช้เชี่ยราสาย (Hook) ไปทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออีกครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อราออกจาก Hook ด้วยการผ่านเปลวไฟจนกว่าจะเกิดเป็นแท่งสีแดง
5. นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมราสายด้วย Lacto phenol cotton blue ไปอ่านผลโครงสร้างของโคนิเดีย และโครงสร้างของราสายภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญที่รับผิดชอบการตรวจ

3.8 การรายงานผลทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา (โดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น)

การรายงานผลเพาะเลี้ยงเชื้อรา จะถูกรายงานโดยอาจารย์ผู้รับผิดชอบและปฏิบัติงานบริการเพาะเชื้อรา โดยเป็นผู้มีใบประกอบวิชาชีพเทคนิคการแพทย์เพื่อให้แพทย์ได้รับข้อมูลที่ถูกต้องส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่แม่นยำ และรวดเร็ว ซึ่งมีขั้นตอนการรายงานผลดังนี้

3.8.1 ตรวจสอบผลการเพาะเชื้อและข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างจากผู้ป่วยในใบส่งตรวจ ได้แก่ ชื่อ-นามสกุล เลข Hospital number เลข Lab number วันเวลาที่เก็บส่งตรวจ วันเวลาที่ส่งตรวจ ชนิดของสิ่งส่งตรวจ ให้ตรงกับข้อมูลสติ๊กเกอร์บาร์โค้ดที่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อราและตรงกับแบบฟอร์มของห้องปฏิบัติการ ดังภาคผนวก ก

3.8.2 เข้าสู่หน้าโปรแกรม E-phis ของทางโรงพยาบาลวชิรพยาบาล และตรวจสอบข้อมูลรายละเอียดการส่งตรวจต่าง ๆ ในระบบให้ตรงกับข้อ 3.8.1 อีกครั้ง

3.8.3 กรอกข้อมูลผลของทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราลงในช่องผลการตรวจผ่านหน้าโปรแกรม E-phis และกดบันทึกข้อมูล เพื่อรายงานผลการตรวจเข้าสู่ระบบของทางโรงพยาบาลวชิรพยาบาล ซึ่งแพทย์จะสามารถเข้าดูข้อมูลผลการตรวจดังกล่าวได้โดยตรง โดยมีรายละเอียดการออกผลดังนี้

3.8.3.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อครบ 30 วัน และไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ รายงานผลว่า

No growth after 30 days

3.8.3.2 หากพบการเจริญเติบโตของเชื้อ และทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อได้ในระดับ genus หรือ species ให้รายงานผลตามที่พบโดย

- ถ้าพบเชื้อทั้งหมด SDA และ SC รายงานผลดังตัวอย่าง

2/2 *Aspergillus fumigatus* (2/2 = Fungal growth from two of two tubes in the culture set)

- ถ้าพบเชื้อเพียงหลอดใดหลอดหนึ่งของ SDA หรือ SC รายงานผลดังตัวอย่าง

1/2 *Aspergillus fumigatus* (1/2 = Fungal growth from one of two tubes in the culture set)

- กรณีของสิ่งส่งตรวจชนิด เส้นผม ขน ผิวหนัง และเล็บ รายงานผลเชื้อตามที่พบจริง ในหลอดอาหารเพาะเชื้อ SDA, SC, SCC คือ 3/3, 2/3 หรือ 1/3

3.9 การควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

การควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกนั้น แบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ การควบคุมคุณภาพภายใน การควบคุมคุณภาพภายนอก และการควบคุมคุณภาพของเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.9.1 การควบคุมคุณภาพภายใน แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่ การทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา และการตรวจสอบอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยมีรายละเอียดดังนี้

- การทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา เป็นกระบวนการที่ปฏิบัติทุกครั้งหลังจากการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งจะช่วยยืนยันได้ว่า อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราในรอบการเตรียมนั้น ๆ ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราของผู้ป่วยเป็นไปตามจริง และป้องกันการรายงานผลที่ผิดพลาดของทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งกระบวนการนี้เป็นการนำหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมบันทึกผลการทดสอบในแบบบันทึกการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังภาคผนวก ข

- การควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อราจะตรวจสอบเฝ้าระวังสถานะของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราถูกจัดเก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสม ช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของอาหารและคงประสิทธิภาพต่อการใช้งาน ซึ่งมีอุณหภูมิที่ยอมรับได้จะอยู่ในช่วง 2-8 องศาเซลเซียส โดยบันทึกข้อมูลการเฝ้าระวังในแบบบันทึกอุณหภูมิตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก ดังภาคผนวก ค

3.9.2 การควบคุมคุณภาพภายนอก ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก มีการประเมินคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment, EQA) ด้วยการประกันคุณภาพงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (External Quality Assurance) ในรูปแบบ Interlaboratory comparison โดยการรับวัตถุทดสอบ (Proficiency test items) (กรณีนี้เป็นเชื้อรากลุ่มราสายและยีสต์) ซึ่งมีคุณสมบัติ ลักษณะ หรือองค์ประกอบใกล้เคียงกับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยมากที่สุด ให้ห้องปฏิบัติการสมาชิกดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ตามวิธีการที่ใช้ในการตรวจประจำวัน และผลการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวจะถูกประเมินโดยวิธีการเปรียบเทียบผล ระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะช่วยสะท้อนระดับคุณภาพของห้องปฏิบัติการ โดยภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก ทำ Interlaboratory comparison ร่วมกับ สถาบันโรคทรวอก สถาบันบำราศนราดูร และสถาบันโรคผิวหนัง โดยมีสถาบันโรคทรวอก เป็นแม่ข่าย ส่งวัตถุทดสอบ (Proficiency test items) ปีละ 2 ครั้ง แต่แต่ละครั้งประกอบไปด้วย เชื้อราสาย 2 หลอด และ เชื้อยีสต์ 2 หลอด โดยเริ่มตั้งแต่ปี 2567 ตามเอกสารเลขที่ สธ. 0316/210

3.9.3 การควบคุมคุณภาพของเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ด้วยการบำรุงรักษา เครื่องมือต่าง ๆ โดยช่างเทคนิคของทางบริษัทที่ผ่านการรับรองมาตรฐาน ซึ่งในระหว่างที่มีการบำรุงรักษา เครื่องมือ ผู้ปฏิบัติงานจะมีการวางแผนการทำงานและดัดใช้เครื่องมือในช่วงเวลาดังกล่าว เพื่อให้เครื่องมือได้รับการตรวจสอบ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกำหนดและจัดจ้างการบำรุงรักษาเครื่องมือเป็นรายปีงบประมาณ แบ่งการดำเนินงาน เป็นปีละ 2 ครั้ง ซึ่งเครื่องมือที่ได้รับการบำรุงรักษามีดังนี้

3.9.3.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) สอบเทียบด้วยการประยุกต์จากมาตรฐาน TLAS G-20 ภายในอากาศและบรรยากาศแรงดันปกติ เฉพาะการสอบเทียบส่วนแสดงผลของตู้ควบคุมอุณหภูมิ การวัดค่า Temperature uniformity, Temperature stability, Overall variation และความแม่นยำของส่วนแสดงผล ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ภายในอากาศขณะไม่มีตัวอย่างทดสอบภายในตู้ โดยมีรายละเอียด ในการตรวจสอบบำรุงรักษาดังนี้

1. ติดตั้ง Standard ทั้ง 9 ตัว ตำแหน่งการวาง Sensor ทั้ง 8 ตัว ที่มุมและห่างจาก ผนังทุกด้านประมาณ 5 เซนติเมตร ตัวที่ 9 จะอยู่ภายใน 2.5 เซนติเมตร จากกึ่งกลางของตู้ตั้ง ค่าอุณหภูมิที่ตัวควบคุมของตู้ตามความต้องการและคอยให้อุณหภูมิเข้าอยู่ในสภาวะคงที่ (Steady state) ก่อนทำการบันทึกค่า

2. ระยะห่างของ Sensor ต้องไม่มากกว่า 100 เซนติเมตร

3. ติดป้ายสติกเกอร์สอบเทียบ วันที่, เดือน,ปี สอบเทียบ และกำหนดสอบเทียบปีถัดไป

3.9.3.2 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) เป็นการสอบเทียบ Temperature Data Logger Manufacturer: Ebro Model: EBI 10, EBI 12 ได้รับการสอบเทียบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 โดย calibration laboratory of Inter Temp Service & Supply Co., Ltd. ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ตรวจสอบเครื่องมือที่จะทำการสอบเทียบ หรือต่อไปจะขอเรียกว่า UUC (Unit Under Calibration) ตรวจสอบข้อมูลเครื่องมือ จุดสอบเทียบ สภาพความพร้อมของเครื่องมือ

2. จัดเตรียมน้ำสะอาดใส่ใน UUC ให้ระดับน้ำ สูงกว่า Heater หรือส่วนให้ความร้อน ขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว

3. ติดตั้ง Standard Temperature Data Logger จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่

3.1) แนบติดกับ Load Temperature Probe (ถ้ามี) ภายในระยะไม่เกิน 15 มิลลิเมตร จากก้าน Probe หรือถ้ากรณี UUC เป็นรุ่นที่ไม่มี Load Temperature Probe ก็ให้ทำการติดตั้งไว้ที่ Temperature Sensor ของ UUC แทน

3.2) ในท่อ Autoclave Chamber Drain (or vent) ภายในระยะไม่เกิน 100 มิลลิเมตร จากส่วนที่เชื่อมต่อสู่ Autoclave Chamber

3.3) ภายในบริเวณครึ่งด้านบนของ Autoclave Chamber (Upper Half)

4. กรอกข้อมูลที่จำเป็นลงในแบบฟอร์ม Calibration Record ให้ครบถ้วน

5. ทำการปรับตั้งค่าอุณหภูมิ และค่าระยะเวลาของ UUC ตามที่ระบุมาในสำเนาใบขอรับบริการ

6. เมื่อค่าของอุณหภูมิเข้าสู่ช่วงของการ Sterilize ให้ทำการบันทึกค่าความดัน จากตัวอ่าน Pressure และอุณหภูมิของ UUC ลงใน Calibration Record

7. รอจนกระทั่ง UUC สิ้นสุดช่วงของการ Sterilize เมื่ออุณหภูมิและความดันลดลง ในระดับที่ใกล้เคียงกับระดับบรรยากาศปกติภายในห้อง หรือในระดับที่สามารถเปิดฝาเครื่องได้ โดยไม่เป็นอันตราย ให้เปิดฝา UUC และนำเครื่องมือ Standard Temperature Data Logger ออกมา

8. Download ข้อมูล และนำผลสอบเทียบที่ได้มาออกใบรายงานผล โดยใบรายงานผล จะแสดงค่าอุณหภูมิแต่ละตำแหน่ง และแสดงค่า Indicating Temperature, Indicating Pressure, Uniformity, Stability, Overall Validation, Holding Time และ Uncertainty of Measurement ในแต่ละจุดอุณหภูมิ

9. จัดส่งใบรายงานผลให้ลูกค้า

3.9.3.3 ตู้ปลอดเชื้อ คลาส 2 หรือ BSC class 2 เป็นการบำรุงรักษาพร้อมออกใบ Certificate of Test Report ตามมาตรฐานการผลิต/คู่มือเครื่อง โดยผ่านการอบรมและสอบผ่านการอบรมเชิงปฏิบัติการ หลักสูตรการตรวจรับรองตู้ชีวนิรภัยระดับต้นของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามพารามิเตอร์ ซึ่งมีรายละเอียดในการบำรุงรักษา ดังนี้

- Downflow Velocity test (การวัดความเร็วอากาศพื้นที่ปฏิบัติงาน)
- Inflow Velocity test (การวัดความเร็วอากาศเข้าตู้)
- HEPA Filter Leak test (การทดสอบรอยรั่วของแผ่นกรอง HEPA filter)
- Airflow Smoke Patterns test (การทดสอบรูปแบบการไหลของอากาศ)
- Ultraviolet radiation test (การทดสอบความเข้มคลื่นรังสีของหลอด UVC)
- Illumination test (การทดสอบความสว่างของพื้นที่ปฏิบัติงาน)
- Site Installation Assessment tests (การทดสอบระบบเตือนและความปลอดภัยของตู้)
- Sound Level test (การทดสอบระดับเสียงของตู้)

บทที่ 4

ปัญหา อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

คู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง การเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการฉบับนี้ ผู้จัดทำได้เรียบเรียงเทคนิค ขั้นตอนต่าง ๆ ของการปฏิบัติงาน เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา มีความรู้ ความเข้าใจในการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ การรับสิ่งส่งตรวจ ตลอดจนการเพาะเลี้ยงสิ่งส่งตรวจบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา การวิเคราะห์ผลทางห้องปฏิบัติการ และใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน รวมถึงลดข้อผิดพลาดต่าง ๆ และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งในระหว่างการปฏิบัติงานนั้นทางผู้จัดทำพบว่า การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา มีปัญหา อุปสรรคและแนวทางการแก้ไขปัญหา ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปัญหา อุปสรรค และแนวทางการแก้ไขปัญหาทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางการแก้ไข
1. ขั้นตอนในการรับสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยนั้นพบว่า ชนิดของสิ่งส่งตรวจที่ระบุมาในระบบ E-phis และในใบส่งตรวจนั้น ไม่ตรงกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการ	ทางผู้ปฏิบัติงานได้ติดต่อไปยังหอของผู้ป่วย และแจ้งรายละเอียดเกี่ยวกับชนิดของสิ่งส่งตรวจให้ปลายสายรับทราบ เมื่อพยาบาลประจำหอผู้ป่วยรับทราบข้อมูลดังกล่าว จึงได้ดำเนินการแก้ไขข้อมูลการส่งตรวจในระบบ E-phis มาใหม่อีกครั้ง จากนั้นผู้ปฏิบัติงานจึงตรวจสอบข้อมูลการส่งตรวจอีกครั้ง และปริ้นใบส่งตรวจใบใหม่ ลงบันทึกข้อมูลปัญหาที่เกิดขึ้น แจ้งผู้ร่วมงาน และแจ้งอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญ
2. จำนวนหลอดแก้วขนาด 18x75 มิลลิเมตรที่ใช้สำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา มีจำนวนไม่เพียงพอต่อปริมาณของสิ่งส่งตรวจที่มีจำนวนเพิ่มขึ้น และเกิดการแตกหักระหว่างปฏิบัติงาน	ผู้ปฏิบัติงานได้นำเชื้อหลอดแก้วดังกล่าวที่ผ่านการใช้งานจากปกติเดือนละ 2 ครั้ง ปรับเป็นเดือนละ 3-4 ครั้ง และทำความสะอาดอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เพียงพอต่อการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในครั้งถัดไป ส่วนหลอดแก้วที่แตกหักจะถูกกำจัดทิ้งเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว
3. สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยที่เป็นชิ้นเนื้อมีขนาดเล็กและมีปริมาณที่น้อยมาก	ผู้ปฏิบัติงานจะตัดแบ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อดังกล่าวให้ได้มากที่สุด เพื่อให้เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา แต่ในกรณีที่มีการติดต่อขอสิ่งส่งตรวจเพื่อส่งตรวจห้องปฏิบัติการอื่นนั้นผู้ปฏิบัติงานไม่สามารถแบ่งสิ่งส่งตรวจให้ห้องปฏิบัติการอื่นได้

ตารางที่ 3 ปัญหา อุปสรรค และแนวทางการแก้ไขปัญหาทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

ปัญหา อุปสรรค	แนวทางการแก้ไข
4. การยกเลิกส่งตรวจจากหอผู้ป่วย โดยที่ทางหอผู้ป่วยได้มีการยกเลิกการส่งตรวจในระบบ E-phis เรียบร้อยแล้ว แต่ทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ยังได้รับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยพร้อมกับใบส่งตรวจ	ทางผู้ปฏิบัติงานได้ติดต่อไปยังหอผู้ป่วยและแจ้งรายละเอียดให้ปลายทางรับทราบ เพื่อให้หอผู้ป่วยยืนยันยกเลิกการส่งตรวจอีกครั้ง จากนั้นผู้ปฏิบัติงานจะบันทึกข้อมูลปัญหาที่เกิดขึ้นแจ้งเพื่อนร่วมงาน และแจ้งอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญ โดยจะจัดเก็บตัวอย่างผู้ป่วยดังกล่าวที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน ก่อนจะกำจัดทิ้งต่อไป
5. เพลทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา SDA เกิดการแห้งหรือปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน	ผู้ปฏิบัติงานได้วางแผนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา จากการเตรียมจำนวน 80 เพลทต่อระยะเวลา 4 เดือน ปรับเป็นการเตรียมจำนวน 40 เพลท ต่อ 2 เดือน ซึ่งเป็นการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนเท่าเดิม แต่ลดจำนวนเพลทและเพิ่มรอบในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา
6. สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์ผลด้วยเทคโนโลยี MALDI-TOF MS ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ <i>Sporothrix</i> ในระยะยีสต์ได้	<i>Sporothrix</i> จัดเป็นราที่มีการเจริญเติบโตสองรูปแบบตามสภาวะอุณหภูมิ ดังนั้น หากไม่สามารถวิเคราะห์ <i>Sporothrix</i> ในระยะยีสต์ได้ ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องเพาะเลี้ยง <i>Sporothrix</i> บนเพลท SDA ใหม่อีกครั้ง และนำเพลทไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาโครงสร้างของโคโคนิเดียในระยะราสายต่อไป

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะ

การเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการนั้น ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการดังกล่าวควรปฏิบัติงานด้วยความละเอียด รอบคอบ ต้องมีการวางแผนด้านการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราให้เหมาะสมกับระยะเวลาที่ใช้งานในแต่ละครั้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บไว้ใช้งาน และต้องเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราได้เป็นอย่างดี มีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอ และต้องมีสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสม และที่สำคัญต้องทำให้ปราศจากการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนหรือให้ผลทางห้องปฏิบัติการที่ผิดพลาด และในระหว่างการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการนั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องสวมเสื้อคลุม ปฏิบัติการที่พอดีตัว และสวมใส่อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคลตามความเหมาะสมขณะปฏิบัติงาน และต้องปฏิบัติตามข้อปฏิบัติในการใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้ตนเองในขณะปฏิบัติงาน และป้องกันการแพร่กระจายเชื้อโรคต่าง ๆ สำหรับขั้นตอนการรับส่งตรวจผู้ป่วยนั้น ผู้ปฏิบัติงานต้องตรวจสอบข้อมูลรายละเอียดต่าง ๆ ในใบส่งตรวจ และสิ่งส่งตรวจที่ส่งมาพร้อมใบส่งตรวจให้ถูกต้อง และตรงกัน โดยไม่มีข้อผิดพลาดใด ๆ และนำสิ่งส่งตรวจมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราได้อย่างถูกต้อง เหมาะสมกับชนิดของสิ่งส่งตรวจ และไม่สลับไปมาระหว่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยรายอื่น เพื่อเป็นการป้องกันข้อผิดพลาดเกี่ยวกับการออกผลของผู้ป่วยที่เกิดจากทางห้องปฏิบัติการ และหลังการปฏิบัติงานเรียบร้อยแล้ว ผู้ปฏิบัติงานต้องหมั่นทำความสะอาดพื้นที่บริเวณทำงานอยู่เสมอ และปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง คอยดูแลรักษาความสะอาดของพื้นที่โดยรอบ เพื่อป้องกันความเสี่ยงในการติดเชื้อโรคที่จะเกิดขึ้นขึ้นกับตนเอง เพื่อนร่วมงาน และป้องกันการแพร่ของเชื้อโรคสู่ชุมชน

บรรณานุกรม

- Chanika Maenchantrarath, Daranee Nutalai, Worada Samosornsuk and Pirayapak Sakoonwatanyoo. (2020). Identification of Yeasts from Clinical Samples Using MALDI-TOF MS. **Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine**. 64(4): 299-310.
- Rychert J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. **Journal of Infectiology**. 2(4): 1-5.
- เนียรวรรณ มีเจริญ. (2560). การแยกเชื้อ อบริสุทธิ. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2567, จาก <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7448-2017-08-11-07-30-49>
- เนียรวรรณ มีเจริญ. (2560). อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์. สืบค้น 10 สิงหาคม 2567, จาก <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7439-2017-08-11-04-33-12>
- พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ตันหยง และนัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ. (2013). เชื้อราทางการแพทย์. **Journal of Medicine and Health Sciences**. 20(2): 31-43.
- สถาพร ภูผาใจ. (2563). เชื้อรา. สืบค้น 12 สิงหาคม 2567, จาก <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/9637-1-9637>

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกสิ่งส่งตรวจ Culture for fungus (66)

แบบบันทึกสิ่งส่งตรวจ Culture for fungus (66)

	รหัส:	แก้ไขครั้งที่:
	FM-CPM1-02	-
	เริ่มใช้วันที่:	หน้า:
	1 กันยายน 2564	1/1

LAB No.	HN/ชื่อ/ วันที่รับส่งตรวจ	สิ่งส่งตรวจ	ผลการตรวจ				วันที่ออกผล	ผู้รายงานผล/ ทวนสอบผล	หมายเหตุ
				สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
1									
			จันทร์						
			พฤหัสบดี						
2				สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
			จันทร์						
			พฤหัสบดี						
3				สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
			จันทร์						
			พฤหัสบดี						
4				สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
			จันทร์						
			พฤหัสบดี						
5				สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4		
			จันทร์						
			พฤหัสบดี						

ภาคผนวก ข

แบบบันทึกการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

	แบบบันทึกการทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา	SOP-LAB CP-001					
1. รายละเอียดการเตรียมอาหาร							
ชื่อผู้เตรียมอาหาร :		ตำแหน่ง :					
วันที่เตรียมอาหาร :							
2. การทดสอบการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง							
2.1 Sabouraud dextrose agar (SDA)	วันที่เริ่มทดสอบ	เวลาเริ่ม	วันที่สิ้นสุดการทดสอบ	เวลาสิ้นสุด	ผลการทดสอบ	☐ ไม่พบโคโลนี	☐ พบโคโลนี
					สรุปผลการทดสอบ	☐ ผ่าน	☐ ไม่ผ่าน
2.2 Sabouraud dextrose with chloramphenicol (SC)	วันที่เริ่มทดสอบ	เวลาเริ่ม	วันที่สิ้นสุดการทดสอบ	เวลาสิ้นสุด	ผลการทดสอบ	☐ ไม่พบโคโลนี	☐ พบโคโลนี
					สรุปผลการทดสอบ	☐ ผ่าน	☐ ไม่ผ่าน
2.3 Sabouraud cycloheximide chloramphenicol agar (SCC)	วันที่เริ่มทดสอบ	เวลาเริ่ม	วันที่สิ้นสุดการทดสอบ	เวลาสิ้นสุด	ผลการทดสอบ	☐ ไม่พบโคโลนี	☐ พบโคโลนี
					สรุปผลการทดสอบ	☐ ผ่าน	☐ ไม่ผ่าน
2.4 Sabouraud dextrose agar plate	วันที่เริ่มทดสอบ	เวลาเริ่ม	วันที่สิ้นสุดการทดสอบ	เวลาสิ้นสุด	ผลการทดสอบ	☐ ไม่พบโคโลนี	☐ พบโคโลนี
					สรุปผลการทดสอบ	☐ ผ่าน	☐ ไม่ผ่าน

ผู้ทดสอบ :

ตำแหน่ง :

วันที่ :

ผู้ตรวจสอบ :

ตำแหน่ง :

วันที่ :

ภาคผนวก ค
แบบฟอร์มบันทึกอุณหภูมิผู้ป่วย 4 องศาเซลเซียส
ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

	แบบฟอร์มบันทึกอุณหภูมิตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก ประจำเดือน พ.ศ.																												SOP-LAB CP-001		
	ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช																														
	วัตถุประสงค์การใช้งาน เพื่อเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา																														
	รหัสเครื่องมือ																		** อุณหภูมิช่วงที่ยอมรับได้ 2-8 องศาเซลเซียส **												
ช่วงเวลา (8.00 น.- 16.00 น.)																															
Date	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
อุณหภูมิภายในตู้																															
อุณหภูมิภายนอกตู้ (อุณหภูมิห้อง)																															
เวลาที่ตรวจสอบ																															
ผู้บันทึก																															
ผู้ตรวจสอบ																															

ผู้รับผิดชอบ :

ตำแหน่ง :

วันที่ :

หัวหน้างาน :

ตำแหน่ง :

วันที่ :

ภาคผนวก ง

บันทึกข้อความขออนุมัติรายชื่อบุคลากรเพื่อปฏิบัติงานบริการ



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก โทร. ๓๑๒๕

ที่ พวช. ๒๖ / ๗๘๕ วันที่ ๑ กันยายน ๒๕๖๔

เรื่อง ขออนุมัติรายชื่อบุคลากรเพื่อปฏิบัติงานบริการ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา (Culture for fungus) และ การเพาะเชื้อ *Acanthamoeba* จากกระจกตาดำ หรือ เลนส์สัมผัส (*Acanthamoeba* NNE culture)

เรียน หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

ด้วยทางภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิกเปิดงานบริการการตรวจการเพาะเลี้ยงเชื้อรา (Culture for fungus) และ การเพาะเชื้อ *Acanthamoeba* จากกระจกตาดำ หรือ เลนส์สัมผัส (*Acanthamoeba* NNE culture) ตั้งแต่วันที่ ๑ กันยายน ๒๕๖๔ โดยได้ผ่านความเห็นชอบจากการประชุมคณะกรรมการบริหารโรงพยาบาล วชิรพยาบาล ครั้งที่ ๑๑/๒๕๖๔ เมื่อวันที่ ๑๒ กรกฎาคม ๒๕๖๔

ในการนี้จึงขออนุมัติให้บุคลากรที่มีรายชื่อดังต่อไปนี้ปฏิบัติงานบริการ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา (Culture for fungus) ในเวลาราชการ ณ ห้องปฏิบัติการ ๖๐๓ ชั้น ๖ อาคารพยาธิ ตั้งแต่วันที่ ๑ กันยายน ๒๕๖๔ เป็นต้นไป โดยรายชื่อผู้ปฏิบัติงานระหว่างเดือนกันยายน - เดือนธันวาคม ๒๕๖๔ ตามตารางเวลาที่แนบมาด้วยนี้

๑. นายรัชฎา	สรรมงคล	นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ
๒. นางปณมพร	วิมลพันธ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
๓. นางสาวศิริทิพย์	รัฐกิจ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
๔. นางสาวสกุลรัตน์	นาคราช	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
๕. นายอัศวิน	คำอินทร์	เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญงาน
๖. นางสาวดวงกมล	พรรณรังสี	นักจัดการงานทั่วไป
๗. นายธนกร	พิไชย	พนักงานทั่วไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ธนา วงษ์สุก

(นายธนา วงษ์สุก)

อาจารย์

หัวหน้าสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก
คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

- คุณหมื่น

- นางสาววิภา ภาควิชา

- นางสาวนฤมล

๙

ตารางปฏิบัติงานบริการ Acanthamoeba-Fungus ปี 2564		
วัน	ชื่อ 1	ชื่อ 2
25 - 27 ส.ค. 64	ทุกคนมาเรียนรู้งาน	
30 ส.ค. - 3 ก.ย. 64	ปถมพร	สกุลรัตน์
6 - 10 ก.ย. 64	สกุลรัตน์	รัชฎา
13 - 17 ก.ย. 64	รัชฎา	ศิรินทิพย์
20 - 24 ก.ย. 64	ศิรินทิพย์	อัศวิน
27 ก.ย. - 1 ต.ค. 64	อัศวิน	ปถมพร
4 - 8 ต.ค. 64	ปถมพร	สกุลรัตน์
11 - 15 ต.ค. 64	สกุลรัตน์	รัชฎา
18 - 22 ต.ค. 64	รัชฎา	ศิรินทิพย์
26 - 29 ต.ค. 64	ศิรินทิพย์	อัศวิน
1 - 5 พ.ย. 64	อัศวิน	ปถมพร
8 - 12 พ.ย. 64	ปถมพร	สกุลรัตน์
15 - 19 พ.ย. 64	สกุลรัตน์	รัชฎา
22 - 26 พ.ย. 64	รัชฎา	ศิรินทิพย์
29 พ.ย. - 3 ธ.ค. 64	ศิรินทิพย์	อัศวิน
7 - 9 ธ.ค. 64	อัศวิน	ปถมพร
13 - 17 ธ.ค. 64	ปถมพร	สกุลรัตน์
20 - 24 ธ.ค. 64	สกุลรัตน์	รัชฎา
27 - 30 ธ.ค. 64	รัชฎา	ศิรินทิพย์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 31 ธันวาคม 2536
สถานที่ปฏิบัติงาน	ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช
การศึกษา	- พ.ศ. 2549 – 2552 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนชลบุรี “สุขบท” - พ.ศ. 2552 – 2555 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนชลบุรี “สุขบท” - พ.ศ. 2555 – 2559 ระดับปริญญาตรี คณะสหเวชศาสตร์ สาขาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประวัติการทำงาน	- พ.ศ. 2559-2560 นักผู้ช่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา - พ.ศ. 2561 ถึงปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน

ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก โทร. ๕๘๒๕

ที่ พวช. ๒๖ /

วันที่

๗ มกราคม ๒๕๖๘

เรื่อง

ขอรับรองการนำคู่มือการปฏิบัติงานมาใช้จริงในภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

เรียน หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

เนื่องด้วย ข้าพเจ้า นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับปฏิบัติการ ตำแหน่งเลขที่ พวช. ๑๒๗๐๓ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับชำนาญการ ได้ดำเนินการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงาน เรื่อง “การเตรียมสิ่งส่งตรวจและเพาะเลี้ยงเชื้อราทางห้องปฏิบัติการ”

ในการนี้ ข้าพเจ้าจึงมีความประสงค์ ขอการรับรองว่าได้มีการนำคู่มือการปฏิบัติงานเรื่องดังกล่าว ข้างต้นไปใช้จริงในการปฏิบัติงานบริการด้านการตรวจ Culture for fungus ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก เพื่อใช้ประกอบการขอประเมินแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ระดับชำนาญการ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ศิรินทิพย์ รัฐกิจ

(นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ)

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ

ที่ พวช.๒๖/๑๙ ลงวันที่ ๗ มกราคม ๒๕๖๘

เรียน หัวหน้าฝ่ายทรัพยากรบุคคล

เพื่อโปรดพิจารณา

รัฐรงค์ ขันธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จตุรงค์ ขันธ์)

หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก

คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล

มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

ศิรินทิพย์ รัฐกิจ
นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ