คำนำ

คู่มือการปฏิบัติงานเรื่อง “วิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม” (Identification of Gram Positive Bacteria in cocci) จัดทำขึ้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทดลอง วินิจฉัย และวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างถูกต้อง โดยเนื้อหาของคู่มือประกอบไปด้วย วิธีการและขั้นตอนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม การเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเทคนิคในการวิเคราะห์อย่างละเอียด

ในการจัดทำคู่มือเล่มนี้ ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อองค์กร หากมีสิ่งใดยังพบว่าบกพร่องผู้จัดทำยินดีน้อมรับข้อเสนอแนะนั้นๆ และนำไปปรับปรุงต่อไป

นางสาวมาลัย ศิลารัมย์
ผู้จัดทำ
มิถุนายน ๒๕๖๑

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญภาพ	ง
บทที่ ๑ บทนำ	
๑.๑ ความเป็นมา ความจำเป็น ความสำคัญ	๑
๑.๒ วัตถุประสงค์	๒
๑.๓ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	๒
๑.๔ ขอบเขตของการจัดทำคู่มือ	๒
๑.๕ คำจำกัดความเบื้องต้น	๒
บทที่ ๒ บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ	
๒.๑ บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง	๔
๒.๒ ลักษณะงานที่ปฏิบัติ	๕
๒.๓ โครงสร้างการบริหารจัดการ	๑๐
๒.๔ ภาระหน้าที่ของหน่วยงาน	๑๖
บทที่ ๓ หลักเกณฑ์วิธีปฏิบัติงานและเงื่อนไข	
๓.๑ หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน	๑๗
๓.๒ วิธีการปฏิบัติงาน	๑๙
๓.๓ เงื่อนไข/ข้อสังเกตุ/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน	๒๙
บทที่ ๔ เทคนิคในการปฏิบัติงาน	
๔.๑ แผนกลยุทธ์ในการปฏิบัติงาน	๓๑
๔.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	๓๑
๔.๓ วิธีการให้บริการกับผู้รับบริการที่มีความพึงพอใจ	๕๖
๔.๔ วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน	๕๖
๔.๕ แนวปฏิบัติที่ดีในการปฏิบัติงาน	๕๗
๔.๖ จรรยาบรรณ คุณธรรม จริยธรรมในการปฏิบัติงาน	๕๘
บทที่ ๕ ปัญหา อุปสรรค แนวทางแก้ไข และพัฒนางาน	
๕.๑ ปัญหา อุปสรรคในการปฏิบัติงาน	๖๐
๕.๒ แนวทางแก้ไขและพัฒนางาน	๖๐
๕.๓ ข้อเสนอแนะ	๖๐

บรรณานุกรม

ภาคผนวก

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ ๑	แผนผังแสดงโครงสร้างการบริหารจัดการของวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข	๑๕
ภาพที่ ๒	แสดงแสดงวิธีการ streak plate โดยวิธี Simple streak technique	๒๐
ภาพที่ ๓	แสดงวิธีการ streak plate โดยวิธี Cross streak technique	๒๑
ภาพที่ ๔	ภาพแสดงการติดสีของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่างๆ	๒๒
ภาพที่ ๕	ภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อกับสารละลาย ๓% Hydrogen peroxide (H๒O๒)	๒๓
ภาพที่ ๖	ภาพแสดงตัวอย่างเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย	๒๔
ภาพที่ ๗	ภาพแสดงความสามารถของยาในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Susceptible)	๒๕
ภาพที่ ๘	ภาพแสดงความสามารถของยาที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Resistant)	๒๖
ภาพที่ ๙	ภาพแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของยาระหว่าง Susceptible และ Resistant	๒๖
ภาพที่ ๑๐	แสดงผลการทดลอง Bile esculin agar test	๒๗
ภาพที่ ๑๑	แสดงผลการทดลอง ๖๕% NaCl (broth)	๒๘
ภาพที่ ๑๒	แสดงผลการทดลอง CAMP test Positive และ CAMP test Negative	๒๙
ภาพที่ ๑๓	แสดงตัวอย่างการตากเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ	๓๐
ภาพที่ ๑๔	แสดงภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์	๓๖
ภาพที่ ๑๕	แสดงภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์	๓๖
ภาพที่ ๑๖	แสดงภาพการเผาห่วงเขี่ยเชื้อ	๓๗
ภาพที่ ๑๗	แสดงภาพวิธีการเขี่ยเชื้อ	๓๗
ภาพที่ ๑๘	แสดงภาพวิธีการลากเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑	๓๗
ภาพที่ ๑๙	แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๑ มาระนาบที่ ๒	๓๘
ภาพที่ ๒๐	แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๒ มาระนาบที่ ๓	๓๘
ภาพที่ ๒๑	แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๓ มาระนาบที่ ๔	๓๘
ภาพที่ ๒๒	แสดงการตั้งค่าตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส	๓๙
ภาพที่ ๒๓	แสดงภาพของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อบ่มครบ ๒๔ ชั่วโมง	๓๙
ภาพที่ ๒๔	แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมที่ถูกย้อมด้วยวิธี Gram stain	๔๗

ภาพที่ ๒๕ แสดงการเกิดปฏิกิยาในการทดสอบ Catalase test ด้วย H๒O๒ ๔๗
ภาพที่ ๒๖ แสดงการเกิดปฏิกิยาในการทดสอบ Coagulase test ๔๘
ภาพที่ ๒๗ แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ๔๘
ภาพที่ ๒๘ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ๔๘
ภาพที่ ๒๙ แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin ๔๙
ภาพที่ ๓๐ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin ๔๙
ภาพที่ ๓๑ แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β – hemolysis ๔๙
ภาพที่ ๓๒ แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α - hemolysis ๕๐
ภาพที่ ๓๓ แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ γ - hemolysis ๕๐
ภาพที่ ๓๔ แสดงผลการทดสอบ Bile esculin ๕๐
ภาพที่ ๓๕ แสดงผลการทดสอบ ๖.๕% NaCl๒ ๕๑
ภาพที่ ๓๖ แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Optochin ๕๑
ภาพที่ ๓๗ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Optochin ๕๑
ภาพที่ ๓๘ แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ๕๒
ภาพที่ ๓๙ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ๕๒
ภาพที่ ๔๐ แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการทดสอบ Camp test ของเชื้อจุลินทรีย์ ๕๒

บทที่ ๑
บทนำ

๑.๑ ความเป็นมา ความจำเป็น ความสำคัญ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย เป็นวิธีการพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่สำคัญมาก โดยเริ่มต้นจากการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ กล่าวคือจะต้องคัดแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) ลงบนจานเพาะเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง โดยวิธีการ Simple streak technique หรือวิธีการ Cross streak technique จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปย้อมสีด้วยวิธีการ Gram stain technique เพื่อศึกษาลักษณะและรูปร่างของเชื้อ และสังเกตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขั้นตอนนี้ถือเป็นวิธีการเบื้องต้น ในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น ๒ กลุ่ม คือ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบวิธีการทางชีวเคมี เพื่อวินิจฉัยจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียต่อไป ในที่นี้ผู้ปฏิบัติงานจะขอกล่าวถึงการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ของวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข

ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มีการจัดเก็บเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน ๘ ชนิด ดังนี้

๑. *Staphylococcus aureus*
๒. *Staphylococcus epidermidis*
๓. *Staphylococcus saprophyticus*
๔. *Streptococcus pyogenese*
๕. *Streptococcus agalactiae*
๖. *Streptococcus pneumonia*
๗. *Streptococcus viridance*
๘. *Enterococcus faecalis*

จากการปฏิบัติงานตั้งแต่ปีพ.ศ. ๒๕๕๒ จนถึงปัจจุบัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมมีอยู่มากมายหลายตระกูล จึงจำเป็นต้องอาศัยการคัดแยกเชื้อจากคุณสมบัติเฉพาะทางชีวเคมี ซึ่งในขั้นตอนการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียนี้ เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน ในบางขั้นตอนจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคที่เกิดจากประสบการณ์ในการปฏิบัติงานจริง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเขียนคู่มือเพื่อเป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และสามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

จากความเป็นมาและความสำคัญดังกล่าว จึงเป็นเหตุให้ผู้เขียนมาเขียนคู่มือการปฏิบัติงานเรื่อง “วิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (Identification of Gram Positive Bacteria in cocci)”

๑.๒ วัตถุประสงค์

๑. เพื่อให้นักวิทยาศาสตร์สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

๒. เพื่อให้การปฏิบัติงานเป็นมาตรฐานเดียวกัน

๓. เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานทราบและเข้าใจว่าควรทำอะไรก่อนและหลัง

๔. เพื่อเป็นมาตรฐานอ้างอิงในการทำงาน

๑.๓ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๑. นักวิทยาศาสตร์สามารถปฏิบัติงานแทนกันได้

๒. การปฏิบัติงานเป็นมาตรฐานเดียวกัน

๓. ผู้ปฏิบัติงานทราบและเข้าใจว่าควรทำอะไรก่อนและหลัง

๔. ใช้เป็นเอกสารอ้างอิงในการปฏิบัติงาน

๕. ผู้ปฏิบัติงานสามารถทดสอบทางชีวเคมี และวินิจฉัยจำแนกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้

๖. ลดข้อผิดพลาดจากการทำงานที่ไม่เป็นระบบ

๑.๔ ขอบเขตของการจัดทำคู่มือ

การปฏิบัติงานตามคู่มือนี้ ครอบคลุมขั้นตอนการคัดเลือกและเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ การจำแนกประเภทของแบคทีเรียในขั้นตอนการย้อม Gram stain การศึกษารูปร่างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย ๑๐๐x ขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี และวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เพื่อใช้เป็นแนวทางการปฏิบัติงานของนักวิทยาศาสตร์ ที่ต้องเตรียมปฏิบัติการให้แก่นักศึกษาก่อนเปิดภาคเรียนเป็นประจำทุกปี

๑.๕ คำจำกัดความเบื้องต้น

แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) คือ แบคทีเรียที่ย้อมติดสีม่วง (Crystal violet) ในการย้อมสีแกรม ซึ่งตรงข้ามกับแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ติดสีม่วงของคริสทัลไวโอเลต แต่จะติดสีแดงของซาฟรานิน หรือฟุกชีน (Sarfanin) แบคทีเรียแกรมบวกสามารถรักษาสีของคริสทัลไวโอเลตได้ เพราะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกนั้น มีเปบทิโดไกลแคนมาก มีความสามารถในการรับสาร Crystal Violet หลังจากการตรึงสีคริสทัลไวโอเลตด้วย Mordanting agent ได้แก่ Gram's Iodine จะเกิดเป็นสารประกอบ complex ที่เรียกว่า Crystal Violet Iodine complex ติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หลังจากการล้างสี (Decolorization) ด้วย decolorizer agent เช่น ๙๕% alcohol จะช่วยให้แบคทีเรียแกรมบวก มีความสามารถที่จะทนต่อ decolorizer อีกทั้งยังทำให้ pore size ใน peptidoglycan มีขนาดลดลงด้วย จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวก ยังคงรักษา Crystal Violet Iodine complex ทำให้ย้อมแกรมแล้วติดสีม่วง

แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) คือ แบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีม่วงของคริสทัลไวโอเลต แต่จะติดสีแดงของซาฟรานินหรือฟุกซีน (Sarfanin) เพราะในผนังเซลล์มีเปบทิโดไกลแคนน้อย หลังจากการล้างสี (Decolorization) ด้วย cecolorizer agent เช่น ๙๕% alcohol คริสทัลไวโอเลตจะถูกชะล้างออกได้โดยง่าย เนื่องจากยังคงมี pore size ขนาดใหญ่กว่าในแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ผนังเซลล์ติดสีแดงของน้ำยาซาฟรานีน

โคโลนี (colony) คือ จุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย (bacteria) รา (mold) ยีสต์ (yeast) ที่ถูกตรึงอยู่กับที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (nutrient agar) เจริญและแบ่งตัวจากเซลล์เดียวเป็นหลายๆเซลล์ จนมีขนาดใหญ่มองเห็นด้วยตาเปล่าได้ การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ (microbial population count) มีหน่วยเป็น colony forming unit ย่อว่า cfu หรือ CFU

Sterile technique คือ เทคนิคที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ โดยทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม และชนิดของวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อ ขอยกตัวอย่างดังนี้

- การทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ๑๕ นาที สามารถทำได้กับวัสดุทุกประเภท เช่น เครื่องแก้ว พลาสติก และอุปกรณ์ชนิดอื่นๆ แล้วนำไปอบแห้งที่ ๕๐-๖๐ องศาเซลเซียส ๒๔-๔๘ ชั่วโมง โดยการนึ่งฆ่าเชื้อนี้ใช้ได้กับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเช่นกัน

- การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยตู้อบฆ่าเชื้อ (Oven) ที่ ๑๘๐ องศาเซลเซียส ๑ ชั่วโมง สามารถทำได้กับวัสดุประเภทแก้วเท่านั้น หรือสาร Immulsion บางชนิด แต่ต้องบรรจุในขวดแก้ว และปิดด้วยกระดาษฟอล์ย หรือวัสดุที่ทนความร้อนแห้งได้

- การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง โดยกรองผ่านฟิวเตอร์ปลอดเชื้อขนาด ๐.๒ – ๐.๔๕ ไมโครลิตร ส่วนมากจะใช้ในกรณีที่สารไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิสูง

Aseptic technique คือ เทคนิคปลอดเชื้อที่ใช้ในขั้นตอนการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ ในขั้นตอนการถ่ายเชื้อ (Transfer, Subculture) การปลูกเชื้อ (inoculation) และการแยกเชื้อ (Isolation) ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ต้องผ่านการ Sterile technique มาแล้ว ยกตัวอย่างเช่น

- การใช้ความร้อนจากเปลวไฟ ในการฆ่าเชื้อบนปากอุปกรณ์ปลอดเชื้อ ที่อาจปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย หรือการทำปฏิบัติการใกล้ๆ กับเปลวไฟเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากภายนอก

- การใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น ๗๐% ในการทำความสะอาดบริเวณที่จะทำปฏิบัติการ เป็นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้

บทที่ ๒
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

๒.๑ บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง

หน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งตามมาตรฐานกำหนดตำแหน่ง

นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ตามมาตรฐานกำหนดตำแหน่ง ที่กำหนดโดย ก.พ.อ. เมื่อวันที่ ๒๑ กันยายน ๒๕๕๓ ได้ระบุบทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ไว้ดังนี้

ปฏิบัติงานในฐานะผู้ปฏิบัติงานที่มีประสบการณ์ โดยใช้ความรู้ความสามารถ ความชำนาญงาน ทักษะ และประสบการณ์สูง ในงานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปฏิบัติงานที่ต้องทำการศึกษา ค้นคว้า ทดลอง วิเคราะห์ สังเคราะห์ หรือวิจัย เพื่อการปฏิบัติงาน พัฒนางาน หรือแก้ไขปัญหาในงานที่มีความยุ่งยาก และมีขอบเขตกว้างขวาง และปฏิบัติงานอื่นตามที่ได้รับมอบหมาย หรือปฏิบัติงานในฐานะหัวหน้างาน มีหน้าที่และความรับผิดชอบในการควบคุมการปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่มีขอบเขตเนื้อหาของงานหลากหลาย และมีขั้นตอนการทำงานที่ยุ่งยากซับซ้อนค่อนข้างมาก โดยต้องกำหนดแนวทางการทำงานที่เหมาะสมกับสถานการณ์ ตลอดจนกำกับตรวจสอบผู้ปฏิบัติงาน เพื่อให้งานที่รับผิดชอบสำเร็จตามวัตถุประสงค์ และปฏิบัติหน้าที่อื่นตามที่ได้รับมอบหมายดังนี้

ด้านการปฏิบัติการ

- ศึกษา ค้นคว้า ทดลอง วิเคราะห์ สังเคราะห์ หรือวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ จัดทำเอกสารวิชาการ คู่มือเกี่ยวกับงานในความรับผิดชอบ เผยแพร่ผลงานทางด้านวิทยาศาสตร์ เพื่อพัฒนางานวิชาการ และพัฒนามาตรฐานการปฏิบัติงานให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

- วิเคราะห์ ทดสอบ ตรวจสอบ ตรวจวัด ตรวจพิสูจน์ และวินิจฉัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของวัตถุตัวอย่าง สอบเทียบเครื่องมือ อุปกรณ์วัด ที่ต้องใช้เทคนิคและประสบการณ์ รักษาระบบบริหารงานคุณภาพ เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการและทันต่อความก้าวหน้าของวิทยาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทำความเห็น สรุปรายงาน เสนอแนะ จัดทำฐานข้อมูลห้องปฏิบัติการ ส่งเสริม สนับสนุน พัฒนาห้องปฏิบัติการ เพื่อแก้ไขปัญหา เพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขัน และนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้อง

- ให้บริการวิชาการด้านต่าง ๆ เช่น ฝึกอบรม เผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการและวิธีการของงานวิทยาศาสตร์ ให้คำปรึกษาแนะนำ ตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่างๆเกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องมีประสิทธิภาพ เข้าร่วมประชุมคณะกรรมการต่างๆที่ได้รับแต่งตั้งเพื่อให้ข้อมูลทางวิชาการประกอบการพิจารณาตัดสินใจ และปฏิบัติหน้าที่อื่นที่เกี่ยวข้อง

ด้านการวางแผน

ร่วมกำหนดนโยบายและแผนงานของหน่วยงานที่สังกัด วางแผนหรือร่วมวางแผนการทำงาน ตามแผนงานหรือโครงการของหน่วยงาน แก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงาน เพื่อให้การดำเนินงานบรรลุตามเป้าหมายและผลสัมฤทธิ์ที่กำหนด

ด้านการประสานงาน

- ประสานการทำงานร่วมกัน โดยมีบทบาทในการให้ความเห็นและคำแนะนำเบื้องต้น แก่สมาชิกในทีมงานหรือหน่วยงานอื่น เพื่อให้เกิดความร่วมมือและผลสัมฤทธิ์ตามที่กำหนดไว้

- ให้ข้อคิดเห็นหรือคำแนะนำเบื้องต้นแก่สมาชิกในทีมงาน หรือบุคคล หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างความเข้าใจและความร่วมมือ ในการดำเนินงานตามที่ได้รับมอบหมาย

ด้านการบริการ

- ให้คำปรึกษา แนะนำ ถ่ายทอดความรู้ ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแก่ นักศึกษาผู้รับบริการทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน รวมทั้งตอบปัญหาและชี้แจงเรื่องต่างๆ เกี่ยวกับงานในหน้าที่ เพื่อให้มีความรู้ความเข้าใจ และสามารถดำเนินงานได้อย่างถูกต้อง

- พัฒนาข้อมูล จัดทำเอกสารวิชาการ สื่อเอกสาร เผยแพร่ ให้บริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ซับซ้อน เพื่อก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ที่สอดคล้อง และสนับสนุนภารกิจของหน่วยงาน

๒.๒ ลักษณะงานที่ปฏิบัติ

๒.๒.๑ ด้านการปฏิบัติการ

(๑) ปฏิบัติงานด้านการเรียนการสอน

๑) ตรวจสอบตารางเรียนในระบบ timetable ของวิทยาลัย

๒) ประสานงานกับอาจารย์ประจำรายวิชา

๓) ศึกษารายละเอียดและหาข้อมูลเพิ่มเติมในหัวข้อปฏิบัติการนั้นๆ และมีแผนสำรองหากเกิดข้อผิดพลาด เพื่อให้สามารถแก้ไขได้ทันเวลา และทำให้นักศึกษาสามารถเรียนปฏิบัติการได้อย่างต่อเนื่อง

๔) วางแผนการปฏิบัติงาน เพื่อลดข้อผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นในระหว่างปฏิบัติการ (ในกรณีที่ปฏิบัติการนั้นเกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ จำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ ก่อนเริ่มปฏิบัติการทุกครั้ง)

๕) จัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ ให้พร้อมก่อนเริ่มการทำปฏิบัติการ

๖) ดูแลและอำนวยความสะดวก รวมถึงให้คำแนะนำที่ถูกต้องด้านเทคนิคการทำปฏิบัติการและการใช้เครื่องมือ ให้แก่นักศึกษาในระหว่างการเรียนปฏิบัติการ

๗) จัดเก็บและทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์หลังทำปฏิบัติการ ทำความสะอาดและปิดเครื่องมือที่ใช้ในการปฏิบัติการ ตรวจสอบความเรียบร้อยก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ

(๒) ปฏิบัติงานคุมสอบ

๑) ประสานงานกับประธานรายวิชา

๒) วางแผนผังห้องสอบตามจำนวนข้อสอบ และนักศึกษา

๓) จัดห้องสอบและติดข้อสอบตามแผนที่วางไว้

๔) จัดเตรียมตัวอย่าง และอุปกรณ์ ให้สอดคล้องกับข้อสอบ

๕) จัดวางตัวอย่างและอุปกรณ์ ที่เตรียมมาให้สอดคล้องกับข้อสอบ โดยใช้ความรู้และประสบการณ์ที่ได้จากการเตรียมและทดสอบปฏิบัติการ

๖) ควบคุมเวลาในการจัดสอบ

๗) จัดเก็บข้อสอบ

(๓) จัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ หาวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แบบใหม่ เพื่อลดปัญหาที่เคยเกิดขึ้น และเป็นวิธีการยืดอายุของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการเรียนปฏิบัติการ ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อในปีต่อไป

(๔) ศึกษาวิธีการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

๑) ศึกษาการใช้งานของเครื่องมือ

๒) จัดทำคู่มือการใช้งานเครื่องมือวิทยาศาสตร์อย่างง่าย

๓) เผยแพร่วิธีการใช้งานเครื่องมืออย่างง่าย โดยผู้ใช้งานมองเห็นได้ชัดเจน

(๕) การทำระบบ ๕ ส ภายในห้องปฏิบัติการ

๑) เลือกทิ้งเอกสาร วัสดุที่ไม่ใช้งานแล้ว และสารเคมีที่หมดอายุ

๒) ทำความสะอาดตู้จัดเก็บอุปกรณ์ให้สะอาดเรียบร้อย

๓) จัดเก็บเอกสาร และวัสดุให้เป็นสัดส่วน ให้หาง่าย

๔) ติดป้ายแสดงให้เห็นชัดเจน สามารถหยิบใช้งานได้ง่าย

(๖) จัดทำระบบการจัดการของเสียภายในห้องปฏิบัติการ

๑) จัดทำรหัสการคัดแยกสารเคมี ตามข้อตกลงของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

๒) จัดหาถังสำหรับแยกสารเคมีแต่ละประเภท

๓) จัดทำสื่อการเรียนการสอน

๔) งานทางด้านมาตรฐานและความปลอดภัย

(๗) การจัดการสารเคมีภายในหน่วยงานห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์ฯ

๑) จัดทำทะเบียนสารเคมี

๒) จัดทำเอกสารความปลอดภัยของเสียเคมีแต่ละชนิด

๓) จัดเก็บสารเคมีแยกประเภทสารเคมี ออกเป็นหมวดหมู่ ประเภท พร้อมติดป้ายสัญลักษณ์ความปลอดภัย

๔) ตรวจเช็คสารเคมีคงเหลือประจำปี

(๘) ความปลอดภัยของการใช้ห้องปฏิบัติการ

๑) ประเมินความเสี่ยงภายในห้องปฏิบัติการ

๒) จัดหาอุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (PPE) ให้มีอย่างเพียงพอต่อการใช้งานในห้องปฏิบัติการ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายในการปฏิบัติงาน

๓) แนะนำการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องให้กับนักศึกษาที่มาใช้งาน รวมถึงการปฏิบัติงานของแม่บ้านที่ทำความสะอาดภายในห้องปฏิบัติการ

๕) ตรวจเช็คอุปกรณ์ป้องกันอันตราย เช่น อ่างล้างตา ถังดับเพลิง ให้พร้อมใช้งานเป็นระยะ

๖) รายงานต่อประธานห้องปฏิบัติการ

(๙) จัดทำคู่มือปฏิบัติงาน เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการปฏิบัติงานที่สร้างความเข้าใจให้ตรงกัน ใช้เป็นแนวทางสำหรับผู้ที่สนใจและสามารถศึกษาได้ด้วยตนเอง

(๑๐) ปฏิบัติงานอื่นๆตามที่ได้รับมอบหมาย

๑) ทำความสะอาดเครื่องแก้วต่างๆ ที่อยู่ภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้หลักการและเทคนิคปลอดเชื้อ และสามารถประยุกต์ใช้เครื่องมือที่มีอยู่ภายในห้องปฏิบัติการ มาใช้ให้เกิดประโยชน์เพื่อลดเวลาการปฏิบัติงาน

๒) ดูแลความสะอาด และความเป็นระเบียบเรียบร้อยโดยรวมภายในพื้นที่ห้องเตรียมปฏิบัติการ, ห้องล้างทำความสะอาด และห้องเรียนปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ CMP ๒๑๒

๒.๒.๒ ด้านการวางแผน

มีส่วนร่วมในการจัดทำโครงการให้บริการระบบสิ่งสนับสนุนการเรียนการสอนด้านห้องปฏิบัติการเป็นประจำทุกปี

๑) วางแผนการจัดซื้อวัสดุ ให้เพียงพอต่อการใช้งานด้านการเรียนการสอน

๒) มีส่วนร่วมในการประเมินผลการดำเนินงาน และแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ในระหว่างจัดทำตามแผนกิจกรรม

๒.๒.๓. ด้านการประสานงาน

(๑) ประสานงานกับหน่วยงานภายใน เช่น ติดต่อประสานงานกับพัสดุ งานแผน การเงิน และหน่วยงานอื่นๆ ที่อยู่ภายในวิทยาลัยแพทย์ เพื่อให้งานห้องปฏิบัติการสามารถดำเนินการต่อไปได้ เช่น ติดต่องานพัสดุ เพื่อขอซื้อวัสดุห้องปฏิบัติการ ติดต่อประสานงานกับงานแผน เพื่อจัดส่งสเปครุภัณฑ์ เป็นต้น

(๒) การประสานงานกับหน่วยงานภายนอก

๑) ติดต่อประสานงานกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เนื่องจากงานห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มีเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในครอบครองหลายสายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นเชื้อตัวอย่างในการเรียนการสอนปฏิบัติการ จึงได้รับการยกเว้นไม่ต้องขออนุญาติในการมีเชื้อไว้ในครอบครอง แต่จำเป็นต้องจดแจ้งข้อมูลเชื้อโรค รายงานกลับไปยังสำนักกำกับพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ทุก ๓ เดือน ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะส่งหนังสือรับรองว่า วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุขได้รับจดแจ้งเป็นหน่วยงานของภาครัฐ ที่มีการครอบครองเชื้อโรคตามบัญชีจดแจ้งเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (แบบ จจ.ช.๑)

ทั้งนี้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการประชุมสัมนาเพื่อแจ้งปัญหาที่เกิดขึ้น และแก้ไขปัญหาร่วมกันเป็นประจำทุกปี ตามขั้นตอนดังนี้

๑.๑) ตรวจเช็คจำนวนเชื้อจากอาจารย์ที่มีเชื้อในครอบครอง

๑.๒) ทำหนังสือจดแจ้ง ส่งเซ็นอนุมัติ

๑.๓) ส่งเอกสารรายงานไปยังกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

๑.๔) ได้รับหนังสือและใบต่ออณุญาติ

๑.๕) จัดเก็บเอกสาร และหลักฐานสำคัญ

๒) ติดต่อประสานงานกับวิทยาเขตร้อน เนื่องจากงานห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มีการเรียนการสอนรายวิชาปรสิตวิทยา จึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างไข่พยาธิดอง ไข่พยาธิบางชนิดหายาก จึงจำเป็นต้องติดต่อประสานงาน ขอความอนุเคราะห์จากกรมเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อขอตัวอย่างดังกล่าว

๓) ติดต่อประสานงานกับโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ เพื่อขอความอนุเคราะห์ ตัวอย่างสิ่งแปลกปลอมจากผู้ป่วย เช่น น้ำเลือด น้ำหนอง พลาสมาที่ผิดปกติ หรือน้ำเลือดกรุ๊ปต่างๆ ดังนั้นงานห้องปฏิบัติการจึงต้องติดต่อประสานงานกับหน่วยงานต่างๆ ภายในโรงพยาบาลเป็นประจำ เพื่อให้การเรียนการสอนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

๔) ติดต่อประสานงานกับบริษัทตัวแทนจำหน่ายสารเคมี และครุภัณฑ์ เนื่องจากในการเรียนปฏิบัติการ จำเป็นต้องมีองค์ประกอบของสารเคมีมาเกี่ยวข้อง ดังนั้นการที่จะให้ได้สารเคมีที่ถูกต้อง และตรงตามความต้องการ นักวิทยาศาสตร์จำเป็นต้องติดต่อขอซื้อด้วยตนเอง

๕) ติดต่อประสานงานกับบริษัทตัวแทนจำหน่ายครุภัณฑ์ เพื่อดำเนินการจัดซื้อจัดจ้างครุภัณฑ์ของหน่วยงาน ให้เป็นไปตามระเบียบว่าด้วยการจัดซื้อจัดจ้างของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

๒.๒.๔ ด้านการบริการ

(๑) การให้บริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

๑) นิสิต บุคลากรภายในหรือภายนอกคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำบันทึกข้อความหรือกรอกแบบฟอร์ม เพื่อขอใช้บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์

๒) ให้บริการคำแนะนำในการใช้งานอย่างถูกวิธี มีสภาพพร้อมใช้งาน รวมถึงแนะนำข้อปฏิบัติในการใช้งาน

๓) แก้ปัญหาเบื้องต้นในการใช้งานครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ของนิสิตและคณาจารย์ ขณะทำปฏิบัติการ

๔) ตรวจเช็คสภาพการใช้งานครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ เมื่อมีการใช้งานเสร็จการลงสมุดบันทึก (Log book) ดูแลความเรียบร้อยบำรุงรักษาเครื่องมือให้มีความพร้อมในการใช้งานในครั้งต่อไป

๕) จัดทำแผนการตรวจเช็คครุภัณฑ์ประจำปี และดำเนินการตรวจเช็คครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ครุภัณฑ์ ประกอบอาคารเพื่อตรวจสอบสภาพการทำงานและสถานที่จัดเก็บ

๖) เมื่อครุภัณฑ์เกิดข้อบกพร่องไม่สามารถใช้งานได้ ดำเนินการประสานงานกับบริษัทผู้ผลิตและผู้จำหน่าย ในการเข้ามาตรวจสอบสภาพ พร้อมทั้งดำเนินการซ่อมบำรุงให้มีการใช้งานได้เป็นปกติ

๗) ดูแลความเรียบร้อยและอำนวยความสะดวก ในกรณีที่มีตัวแทนจากบริษัทมาทำการติดตั้งหรือซ่อมแซมเครื่องมือวิทยาศาสตร์

๘) จัดเก็บรายงานของบริษัท ในการเข้ามาซ่อมแซมครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ เพื่อเป็นประวัติข้อมูลของเครื่องมือวิทยาศาสตร์นั้นๆ

๙) จัดทำสมุดบันทึกการใช้งานเครื่องมือวิทยาศาสตร์ (Log book)

๑๐) ตรวจเช็คครุภัณฑ์ประจำปี ครุภัณฑ์ที่มีการเคลื่อนย้ายบันทึกประวัติ ส่วนครุภัณฑ์ที่ชำรุดหรือไม่มีความพร้อมในการใช้งานดำเนินการส่งซ่อมพร้อมบันทึกประวัติ ให้บริการยืม-คืน วัสดุ อุปกรณ์ประจำห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข แก่นิสิต บุคลากร อาจารย์ ทั้งภายในและภายนอกวิทยาลัย

(๒) งานให้บริการเกี่ยวกับ อุปกรณ์ และหนังสือ

๑) นิสิต บุคลากร ภายในหรือภายนอกวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข ทำบันทึกข้อความ หรือกรอกแบบฟอร์ม เพื่อขอยืมอุปกรณ์หรือหนังสือ

๒) เบิกจ่ายอุปกรณ์ หนังสือ ตามบันทึกข้อความหรือแบบฟอร์ม

๓) รับคืน อุปกรณ์ หนังสือ ตามที่กำหนดในบันทึกข้อความหรือแบบฟอร์ม พร้อมตรวจเช็คความสมบูรณ์ของอุปกรณ์หรือหนังสือ ให้มีความถูกต้อง และจัดเก็บในสถานที่จัดเก็บวัสดุ อุปกรณ์หรือหนังสือนั้น ๆ

๔) รายงานความเสียหายของวัสดุอุปกรณ์ และจัดทำเป็นฐานข้อมูล เพื่อใช้ในการบริหารจัดการและหาแนวทางการแก้ไข

(๓) งานให้บริการเบิกจ่ายวัสดุใช้แล้วทิ้ง และสารเคมี

๑) นิสิต บุคลากร ภายในวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข กรอกแบบฟอร์มเบิกจ่ายตามบันทึกข้อความหรือแบบฟอร์ม

๓) สรุปรายการเบิกจ่าย จำนวน และเช็คสต๊อกวัสดุใช้แล้วทิ้ง และสารเคมี

๔) สั่งซื้อวัสดุ และสารเคมีเพิ่มเติม

(๔) งานบริการให้คำปรึกษาแก่นักศึกษา อาจารย์ และบุคคลภายนอก โดยให้คำปรึกษาแนะนำและตอบปัญหาด้านการปฏิบัติการ การใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับงานปฏิบัติการแก่อาจารย์และนักศึกษา

๒.๓ โครงสร้างการบริการจัดการ

วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยมีสำนักงานเลขานุการเป็นหน่วยงานกลางในการบริหารวิทยาลัย ทำหน้าที่สนับสนุนให้งานของวิทยาลัยเป็นไปอย่างราบรื่นและบรรลุผลสำเร็จ ไม่ว่าจะเป็นการผลิตบัณฑิต งานด้านบริหารวิชาการ งานวิจัย งานบริการทางวิชาการ และงานทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม โดยสำนักงานมีหน้าที่ในการประสานงาน ดำเนินการและติดตามประเมิลผล เพื่อให้งานของวิทยาลัยฯ สามารถดำเนินการให้บรรลุวัตถุประสงค์ตามเป้าหมายและนโยบายที่ผู้บริหารกำหนดไว้ นอกจากนั้นยังมีหน้าที่ในการ กำกับ ตรวจสอบ วิเคราะห์ กลั่นกรองงานในด้านต่างๆ ให้เป็นไปอย่างถูกต้องตาม กฎ ระเบียบ ข้อบังคับของทางราชการ และเพื่อให้สอดคล้องกับภารกิจของวิทยาลัยฯ และเพื่อให้การปฏิบัติงานมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น สำนักงานจึงได้จัดแบ่งภาระหน้าที่ตามลักษณะงานออกเป็น ๑๑ งาน ประกอบด้วย

๑. งานบริหารงานทั่วไป
๒. งานการเงินและพัสดุ
๓. งานประกันคุณภาพนักศึกษาและสารสนเทศ
๔. งานแผนและนโยบาย
๕. งานบริหารบุคคล
๖. งานบริการการศึกษา
๗. งานห้องปฏิบัติการ
๘. งานคอมพิวเตอร์และเครือข่าย
๙. งานเอกสารสนเทศ
๑๐. งานพัฒนานักศึกษา
๑๑. งานวิจัย บริการวิชาการ และทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

โดยที่งานห้องปฏิบัติการ มีหน้าที่รับผิดชอบงานสนับสนุนการเรียนการสอนในด้านปฏิบัติการ วางแผนติดต่อประสานงาน ให้คำปรึกษา และให้บริการสิ่งสนับสนุนต่างๆ งานห้องปฏิบัติการมีพื้นที่รับผิดชอบแบ่งเป็นห้องปฏิบัติการสำหรับจัดการเรียนการสอนดังนี้ ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและอนามัยสิ่งแวดล้อม, ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา, ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาและสรีรวิทยา, ห้องปฏิบัติการทักษะพื้นฐานทางคลินิก และห้องปฏิบัติการมหกายวิภาคศาสตร์ มีนักวิทยาศาสตร์ทั้งหมด ๓ คน และพนักงานรักษาศพ ๑ คน

โดยได้แบ่งหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเรียนการสอนปฏิบัติการ ตามความรับผิดชอบเป็นรายวิชามีรายละเอียดดังนี้

คนที่ ๑ นายทักษกร วงษ์สีดา ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ รับผิดชอบดูแลห้องปฏิบัติการ CMP ๒๑๓ โดยมีรายวิชาที่รับผิดชอบดังนี้

๑. รายวิชาพันธุศาสตร์การหลักสูตรแพทยศาสตร์และพัฒนาการชีวิตมนุษย์ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการพัฒนาการของตัวอ่อนและทารกในครรภ์
- ปฏิบัติการภาวะผิดปกติแต่กำเนิด โรคที่พบในเด็ก

๒. รายวิชาหลักการทั่วไปทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการ Cellular pathology
- ปฏิบัติการ Repair and healthy process
- ปฏิบัติการ Pathology of Neoplasia

๓. รายวิชาระบบผิวหนังและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนังเบื้องต้น
- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนัง
- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อเกี่ยวพันลำตัว
- ปฏิบัติการพยาธิกำเนิด พยาธิสรีระ พยาธิสภาพ พยาธิวิทยาคลินิก อาการวิทยา และเวชศาสตร์ป้องกัน
- ปฏิบัติการการทดสอบ และการแปลผลทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวกับพยาธิสภาพของโรค

๔. รายวิชาระบบกล้ามเนื้อโครงกระดูก นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของระบบกระดูก
- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อแกนกลางของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก
- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อโครงสร้างและหน้าที่ระดับจุลภาค
- ปฏิบัติการเนื้อเยื่อโครงสร้างและหน้าที่ของกระดูก
- ปฏิบัติการสรีระวิทยาของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก
- ปฏิบัติการโรคมะเร็งของระบบกล้ามเนื้อและกระดูก
- ปฏิบัติการโรคกล้ามเนื้ออักเสบและประสาท

๕. รายวิชาระบบย่อยอาหารและโภชนาการ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการ Organ structure
- ปฏิบัติการ Histology of digestive system
- ปฏิบัติการ Physiology of GI
- ปฏิบัติการ Infectious, Inflammatory
- ปฏิบัติการ Neoplastic disorder and tumor like conditions
- ปฏิบัติการเงาและภาพรังสีของระบบทางเดินอาหาร

๖. รายวิชาระบบปัสสาวะ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการโครงสร้างและหน้าที่ระดับมหภาคของระบบปัสสาวะ
- ปฏิบัติการการประเมินการทำงานของไต Osmosis
- ปฏิบัติการความสัมพันธ์ทางคลินิกและความผิดปกติของโครงสร้างระบบปัสสาวะ
- ปฏิบัติการการเจริญและการพัฒนาที่ผิดปกติของระบบปัสสาวะ
- ปฏิบัติการความสัมพันธ์ระหว่างเงาภาพของรังสีและพยาธิสภาพของระบบปัสสาวะ

๗. รายวิชาระบบต่อมไร้ท่อ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการโครงสร้างของต่อมไร้ท่อระดับมหกายวิภาค
- ปฏิบัติการโครงสร้างของต่อมไร้ท่อระดับจุลภาค
- ปฏิบัติการการพัฒนาและความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อ
- ปฏิบัติการความสัมพันธ์ระหว่างสรีระวิทยา ลักษณะทางคลินิกและการแปลผลของฮอร์โมนระบบต่อมไร้ท่อ

๘. รายวิชาระบบสืบพันธุ์ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการ โครงสร้างหน้าที่ของระบบสืบพันธุ์
- ปฏิบัติการ เซลล์และเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์
- ปฏิบัติการ Pathology of female reproductive system
- ปฏิบัติการ Pathology of male reproductive system
- ปฏิบัติการเงาภาพของรังสี female and male reproductive system

๙ รายวิชาสรีระวิทยา หลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต และหลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๑

- ปฏิบัติการองค์ประกอบของเซลล์
- ปฏิบัติการIntroduction of anatomy
- ปฏิบัติการระบบผิวหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน
- ปฏิบัติการระบบกล้ามเนื้อ โครงกระดูก
- ปฏิบัติการระบบเลือด และน้ำเหลือง
- ปฏิบัติการระบบประสาท
- ปฏิบัติการระบบหัวใจและหลอดเลือด
- ปฏิบัติการระบบหายใจ
- ปฏิบัติการระบบทางเดินอาหาร
- ปฏิบัติการระบบขับถ่าย ปัสสาวะ
- ปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์ระบบต่อมไร้ท่อ
- ปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์ระบบสืบพันธุ์

คนที่ ๒ นางสาวมาลัย ศิลารัมย์ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ รับผิดชอบดูแลห้องปฏิบัติการ CMP ๒๑๒ โดยมีรายวิชาที่รับผิดชอบดังนี้

๑. รายวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาสำหรับนักศึกษาชั้นปีที่ ๒ หลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต นักศึกษาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตบัณฑิต และนักศึกษาหลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต

- ปฏิบัติการบทนำแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์
- ปฏิบัติการแบคทีเรียแกรมบวก
- ปฏิบัติการแบคทีเรียแกรมลบ
- ปฏิบัติการไวรัสก่อโรคในคน
- ปฏิบัติการบทนำราวิทยาทางการแพทย์
- ปฏิบัติการราก่อโรคในคน
- ปฏิบัติการบทนำทางปรสิตทางการแพทย์
- ปฏิบัติการโปรโตซัวทางการแพทย์
- ปฏิบัติการหนอนพยาธิทางการแพทย์
- ปฏิบัติการกีฏวิทยาทางการแพทย์

๒. รายวิชาหลักการทั่วไปทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการการเก็บและพิจารณาสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ อย่างสมเหตุสมผล

๓. รายวิชาหลักการทั่วไปทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการหลักการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ และการแปลผลความไวของยาปฏิชีวนะต่อแบคทีเรีย
- ปฏิบัติการ Production & function of granulocyte, NK, macrophage,T-lymphocyte and their receptors
- ปฏิบัติการ production & function of B lymphocytes & plasma cells, immunoglobulin (AB), structure and biologic properties , agglutination
- ปฏิบัติการหลักการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกัน

๔. รายวิชาระบบเลือดและน้ำเหลือง สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตร์ ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการส่วนประกอบของเลือดและผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาที่เกิดจากการให้เลือด stem cell และการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติกาธนาคารเลือด
- ปฏิบัติการ Complete Blood Count

๕. รายวิชาระบบผิวหนังและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา จุลชีววิทยา ปรสิตวิทยา และการติดเชื้อ

๖. รายวิชาระบบกล้ามเนื้อและโครงกระดูก สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการการตรวจวิเคราะห์และแปลผลน้ำไขข้อ

๗. รายวิชารายวิชาระบบประสาท สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการ Cerebrospinal fluid analysis และการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก

๘. รายวิชาระบบหัวใจและหลอดเลือด สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการโรคติดเชื้อที่พบบ่อยใน CVS

๙. รายวิชาระบบหายใจ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

- ปฏิบัติการการตรวจเสมหะ และหลักการแปลผลตรวจวิเคราะห์น้ำ จากช่องเยื่อหุ้มปอด

๑๐.รายวิชาระบบย่อยอาหารและโภชนาการ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการ Infectious, inflammatory, and immunologic disorders ๑
- ปฏิบัติการ Infectious, inflammatory, and immunologic disorders ๒

๑๑. รายวิชาระบบปัสสาวะ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการการเก็บปัสสาวะเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจน้ำปัสสาวะ
- ปฏิบัติการเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะที่พบบ่อย

๑๒. รายวิชาระบบสืบพันธ์ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

- ปฏิบัติการการติดเชื้อจุลชีพและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
- ปฏิบัติการ Infectious, inflammatory, and immunologic disorders (๒)

คนที่ ๓ นางสาวอนุสรา สารักษ์ ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ รับผิดชอบดูแลห้องปฏิบัติการ CMP ๒๑๑ และ CMP ๓๑๕ โดยมีรายวิชาที่รับผิดชอบดังนี้

๑. รายวิชาการตรวจวิเคราะห์ด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม ชั้นปีที่ ๓

๒. รายวิชาการสุ่มเก็บและวิเคราะห์ด้านอากาศ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม ชั้นปีที่ ๓

๓. รายวิชาปัญหาพิเศษทางสาธารณสุข สำหรับนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม ชั้นปีที่ ๔

๔. รายวิชาหลักการทั่วไปทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๑ นักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๑, หลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๒

๕. รายวิชาการดูแลผู้ป่วยเบื้องต้น สำหรับนักศึกษาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

๖. รายวิชาการปฐมพยาบาล สำหรับนักศึกษาสาขาวิชาหลักสูตรสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

๗. รายวิชาบทนำสู่เวชศาสตร์คลินิก ๑ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

๘. รายวิชาบทนำสู่เวชศาสตร์คลินิก ๒ สำหรับนักศึกษาหลักสูตรแพทยศาสตรบัณฑิต ชั้นปีที่ ๓

คนที่ ๔ นายสุพจน์ อ่อนรัตน์ ตำแหน่ง พนักงานรักษาศพ รับผิดชอบห้องปฏิบัติการมหกายวิภาคศาสตร์ โดยมีหน้าที่รับผิดชอบดังนี้

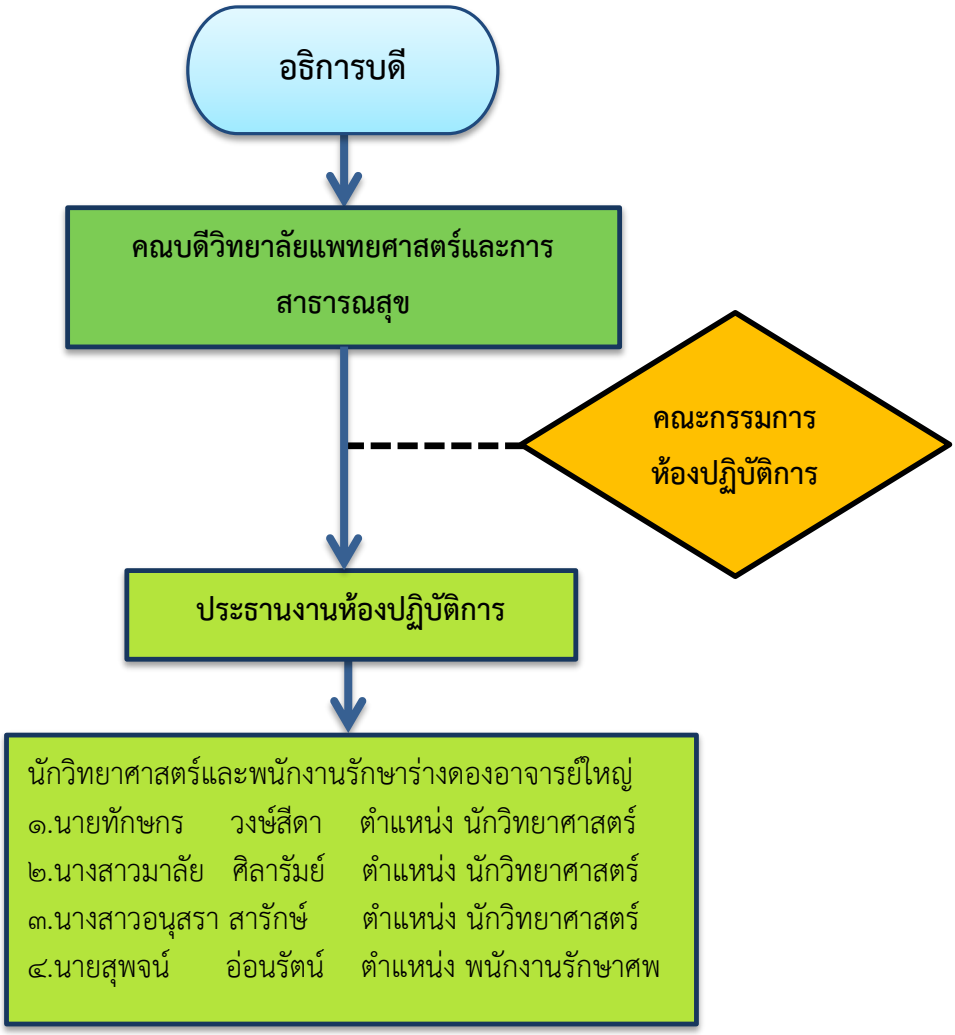
๑. ปฏิบัติงานด้านการเรียนการสอนรายวิชาปฏิบัติการกายวิภาคศาสตร์

๒. ดูแลรักษาร่างอาจารย์ใหญ่ให้อยู่ในสภาพที่ใช้งานได้

๓. ดูแล และอำนวยความสะดวกการปฏิบัติการของอาจารย์ และนักศึกษา

๔. ให้คำปรึกษา เทคนิคด้านการชำแหละ และดูแลวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการ

งานห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ มีโครงสร้างการบริหารจัดการดังแผนภาพต่อไปนี้



ภาพที่ ๑ แผนผังโครงสร้างการบริหารจัดการของงานห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข

๒.๔ ภาระหน้าที่ของหน่วยงาน

ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ดำเนินการ กำกับ ดูแล ส่งเสริม งานด้านวิทยาศาสตร์ภายในวิทยาลัยแพทย์ศาสตร์และการสาธารณสุข ในด้านงานวิจัย และด้านการเรียนการสอนประกอบด้วย

๒.๔.๑ การบริการด้านการเรียนการสอน การเบิก - จ่าย ยืม - คืน วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ให้กับอาจารย์ นักศึกษา บุคลากร รวมถึงบุคคลภายนอกที่มาขอใช้บริการ

๒.๔.๒ มุ่งเน้นและพัฒนานักศึกษาให้เกิดทักษะทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีเครื่องมือ มีความรู้ในทฤษฎีพื้นฐาน และสามารถนำความรู้ไปคิดแก้ปัญหาในพื้นที่ได้จริง

๒.๔.๓ จัดหาวัสดุ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ให้พอเพียงต่อจำนวนนักศึกษา เพื่อฝึกฝนทักษะด้านการปฏิบัติการ เพื่อเป็นพื้นฐานนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

บทที่ ๓
หลักเกณฑ์ วิธีการปฏิบัติงาน และเงื่อนไข

๓.๑ หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

การคัดแยกชนิดของแบคทีเรียที่ไม่ทราบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดนั้น ต้องอาศัยลักษณะเฉพาะที่ปรากฏ (specific characteristical appearance) หลายอย่างประกอบกัน โดยใช้หลักการเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียที่ไม่ทราบชนิด และแบคทีเรียที่ทราบชนิดแล้ว โดยอาศัยหลักเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียดังนี้

๓.๑.๑ การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษารูปร่างโครงสร้างหรือคุณสมบัติต่างๆของจุลินทรีย์นั้น จะศึกษาจากตัวอย่างของจริงจากธรรมชาติแต่เพียงอย่างเดียวนับว่ายังมีไม่เพียงพอ จึงจำเป็นจะต้องนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงและขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ศึกษาเพื่อสังเกตลักษณะต่างๆเพิ่มมากขึ้น อาหารซึ่งใช้เลี้ยงจุลินทรีย์นั้น อาจมีลักษณะทางกายภาพหลายลักษณะ เช่น

- Solid media (agar) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมวุ้นลงไป ตามปกติจะเติม ๑๕ กรัมต่อลิตร อาหารในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ solid media จะอยู่ในจานแก้ว (petri dish) หรืออยู่ในหลอดทดสอบซึ่งมีผิวหน้าเอียงเรียก slant หรือ slope อาหารในหลอดทดสอบที่ผิวหน้าไม่เอียงเรียก deep tube เพื่อใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย

- Semisolid media คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมวุ้นลงไปปริมาณน้อยกว่า solid media คือประมาณ ๐.๕% หรือน้อยกว่า

- Liquid media (Broth) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ได้เติมวุ้นลงไป ดังนั้นอาหารจึงเป็นของเหลว เช่น Nutrient broth เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นสามารถแบ่งตามส่วนประกอบทางเคมีได้เป็น ๒ พวกคือ

๑) Natural or chemically non-defined media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เราไม่รู้ส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากธรรมชาติ เช่น มันฝรั่ง หรืออาหารที่ประกอบด้วย peptone, yeast extract, meat infusion, serum, beef eatract หรือ casein hydrolysate

๒) Synthetic or Artificial or Chemically define media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่รู้ส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนว่าประกอบด้วยสารอะไรอย่างละเท่าใด สามารถจะเตรียมได้เหมือนกันทุกครั้ง ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็น inorganic salt ต่างๆ และชนิด organic synthetic media เช่น รู้ว่าอาหารแต่ละชนิดประกอบด้วย amino acid อะไรบ้าง อย่างละเท่าใด เป็นต้น

ผู้ปฏิบัติงานจะสามารถใช้อาหารที่เหมาะสมต่อการใช้งานได้ เราสามารถแบ่งประเภทของอาหารตามวัตถุประสงค์ของการใช้งานได้ดังนี้

Enrichment media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เติมสารอาหารบางอย่างพิเศษ นอกเหนือไปจากธาตุอาหารที่จุลินทรีย์ทั่วไปใช้ ทั้งนี้เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เราต้องการเลี้ยงเจริญได้ดียิ่งขึ้น เช่น การเติม blood serum วิตามิน หรือเติมสารสกัดที่ได้ จากเนื้อเยื่อพืชหรือเนื้อเยื่อสัตว์ลงไปใน nutrient broth หรือ nutrient agar อาหารชนิดนี้ใช้สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์พวก fastidious heterotroph เช่น จุลินทรีย์ที่เป็น pathogen ต่างๆ

Selective media อาหารที่มีการเติมสารเคมีบางตัวลงใน nutrient agar เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางกลุ่ม โดยที่สารนี้จะไม่ยับยั้งเชื้อกลุ่มที่เราต้องการจะเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น crystal violet ที่ความเข้มข้นบางช่วง จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ในทำนองเดียวกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารคาร์บอนเป็นน้ำตาล maltose จะสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาล maltose ให้สามารถเจริญได้ โดยใช้หลักที่ว่าจะคัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่แปลกออกไปได้อย่างง่ายๆ โดยการเติมสารเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แทนสารประกอบคาร์บอนอย่างอื่น

Differential media คืออาหารที่เติมสารเคมีตัวอื่นลงไปซึ่งอาจจะมีผลต่อชนิดของเชื้อที่จะเจริญหรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะไป หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ ตัวอย่างเช่น เชื้อผสมของแบคทีเรีย เพาะเลี้ยงลงใน blood-agar medium แบคทีเรียบางพวกอาจจะย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนแบคทีเรียอื่นๆไม่มีความสามารถนี้ สังเกตได้จาก clear zone รวมทั้งโคโลนีจะแสดงถึง hemolysis ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียเป็นพวก hemolytic หรือ nonhemolytic bacteria จากการเจริญบนอาหารเดียวกัน

ดังนั้น blood agar medium เป็นทั้งอาหาร enrich และ differential medium Assay medium คืออาหารที่มีส่วนประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบหาวิตามินต่างๆ amino acid ต่างๆ และ anitibiotics

จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีหลายชนิด ในการที่จะเลือกใช้อาหารชนิดใดนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และความเหมาะสม กล่าวคือมีธาตุอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และมีความเข้มข้นเหมาะสม มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด ไม่มีสารพิษ ไม่มีสิ่งมีชีวิตใดๆ ปนเปื้อนอยู่ในอาหารนั้น

๓.๑.๒ การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบๆตัวผู้ปฏิบัติงาน หรือแม้แต่ร่างกายของคนก็มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด อาจปนเปื้อนในหลอดเพาะเชื้อได้ หลักการคัดแยกเชื้อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) คือจะต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Single colony) จำนวนมาก โดยทุกขั้นตอนต้องเป็นวิธีการที่ทำให้ปราศจากเชื้อปนเปื้อน (Sterile technique) จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด

๓.๑.๓ การสังเกตุลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

แบคทีเรียจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน การตรวจดูรูปร่างของเซลล์ การจัดเรียงตัว การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การสร้างแคปซูล และลักษณะของแฟลกเจลลา ด้วยการย้อมสีเฉพาะ แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย ๑๐๐x สามารถนำมาใช้ประกอบ และพิจารณาการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้

๓.๑.๔ การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

แบคทีเรียจะมีเอนไซม์ที่สามารถใช้ในการย่อยอาหาร และสังเคราะห์ชีวโมเลกุลที่แตกต่างกัน ผลิตผลที่เกิดจากการย่อยสลายอาหาร และชีวโมเลกุลที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจะไม่เหมือนกันด้วย ดังนั้นจึงให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้ในการคัดแยกและพิสูจน์ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

๓.๒ วิธีการปฏิบัติงาน

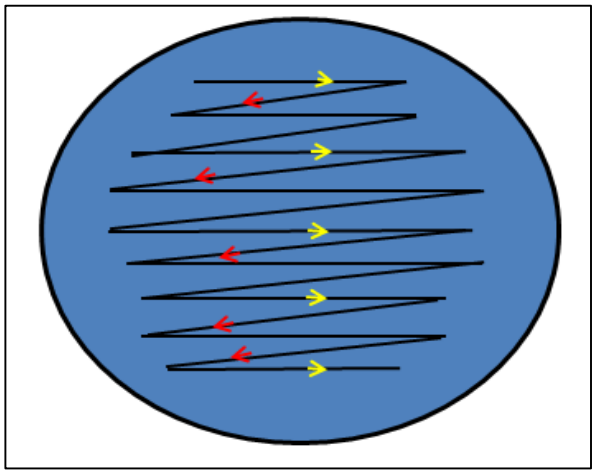
๓.๒.๑ วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ อาจใช้อาหารสำเร็จรูปซึ่งมีองค์ประกอบชนิดต่างๆผสมอยู่เรียบร้อยแล้ว หรือชั่งสารแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของอาหารชนิดนั้น เมื่อชั่งอาหารเรียบร้อยแล้ว ให้ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรที่ต้องการเตรียม อาหารที่จะเตรียมชั่งกี่กรัมให้อ่านจากฉลากข้างขวด หลังจากนั้นคนอาหารให้เข้ากันในน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มจนละลาย ปรับ pH ด้วยเครื่อง pH meter แล้วจึงถ่ายลงในหลอดทดสอบ หรือขวดปิดจุก นำไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) โดยใช้ความร้อน ๑๒๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Solid media ที่อยู่ในเพลท ต้องเตรียมลงในขวดหรือภาชนะก่อน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ภายหลังผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วจึงค่อยนำมาเทลงในเพลท (ซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยตู้อบควบคุมอุณหภูมิ ๑๘๐ องศาเซลเซียส ๒ ชั่วโมง) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น slant จะถูกบรรจุลงใน test tube หรือภาชนะที่เหมาะสม แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร เมื่อนำออกจากเครื่อง autoclave แล้วให้นำ rack ที่มี test tube เหล่านั้น มาวางเอียงจนกระทั่งอาหารเย็นก็จะเกิด slant ขึ้น ถ้าต้องการเตรียม deep agar ก็ไม่ต้องเอียง rack ทิ้งให้อาหารเย็น อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็น broth ให้บรรจุลงใน test tube หรือใน flask หรือในขวดได้เลย แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด มีองค์ประกอบของสารบางตัวในอาหาร ที่สลายตัวได้ง่ายเมื่อผ่านความร้อน ดังนั้นควรแยกสารประกอบที่สลายตัวได้ง่ายออก ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ให้ชั่งแล้วละลายน้ำต้ม ปรับ pH แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เมื่ออาหารส่วนนี้นำออกจาก autoclave ทิ้งให้เย็น แล้วจึงค่อยเติมอาหารอีกส่วนลงไปด้วยวิธีปลอดเชื้อจุลินทรีย์ โดยอาหารส่วนที่ไม่สามารถผ่านความร้อน ต้องนำไปกรองด้วยเครื่องกรองด้วยวิธีปลอดเชื้อ เครื่องกรองนี้จะมีแผ่นกรองที่มีรูขนาด ๐.๔๕ ไมครอน จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ติดอยู่บนกระดาษกรอง อาหารที่ผ่านแผ่นกรองไปจะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

๓.๒.๒ วิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

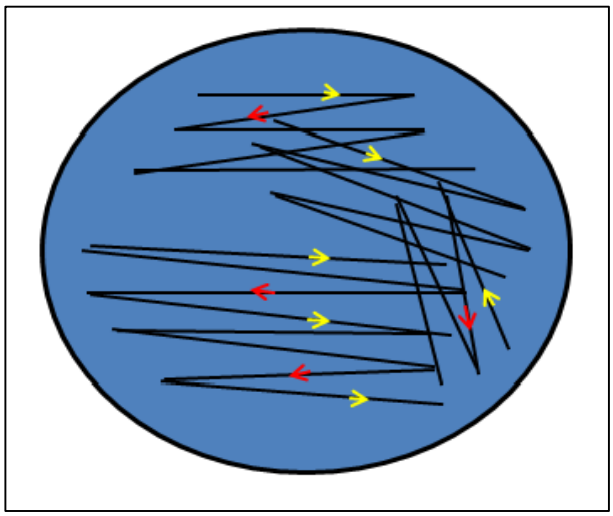
เป็นวิธีการที่ต้องการแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Single colony) จำนวนมาก จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด การคัดแยกเชื้อภายในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุขนั้นใช้ ๒ วิธีในการคัดแยกคือ Simple streak technique และ Cross streak technique

Simple streak technique คือ วิธีการที่ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะตัวอย่างแล้วลากหรือขีด (streak) ลงบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ในอุณหภูมิที่เหมาะสม



ภาพที่ ๒ แสดงวิธีการ streak plate โดยวิธี Simple streak technique

Cross streak technique คือ วิธีการที่ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะตัวอย่างแล้วลากหรือขีด (streak) ลงบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เพียง ๑ ส่วน ๔ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ๑ เพลท เผาห่วงฆ่าเชื้อจนร้อนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนที่ ๑ ลากมาส่วนที่ ๒ เผาห่วงฆ่าเชื้อจนร้อนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนที่ ๒ ลากมาส่วนที่ ๓ เผาห่วงฆ่าเชื้อจนร้อนแดงทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อจากส่วนที่ ๓ ลากมาส่วนที่ ๔ จากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ในอุณหภูมิที่เหมาะสม



ภาพที่ ๓ แสดงวิธีการ streak plate โดยวิธี Cross streak technique

๓.๒.๓ วิธีการสังเกตุลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม (Gram's staining)

หลักการ

การที่แบคทีเรียจะติดสีแกรมเป็นสีใดขึ้นอยู่กับส่วนประกอบทางเคมี และโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่หนาทำให้ติดสีคริสตอลไวโอเลตได้ดี และเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะกลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (Crystal violet iodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย ๙๕% แอลกอฮอล์ ขั้นตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ตอนนี้แบคทีเรียนแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียนแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อยผลึกของสียังคงติดแน่นอยู่ (crystal violet สีน้ำเงินหรือม่วง)

วิธีการทดสอบ

๑) ทำความสะอาดสไลด์ให้สะอาดด้วย alcohol แล้วปล่อยให้แห้ง

๒) หยด water หรือ normal saline ลงไป ๑ หยดบน glass slide โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อลงไปละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้เป็นวงกว้างๆ บางๆ ประมาณ ๑ เหรียญบาทเล็ก รอให้ slide แห้งแล้ว Fix slide ด้วยไฟไปมา ๓ ครั้ง

๓) หยดสี Crystal violet ตั้งทิ้งไว้ ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ

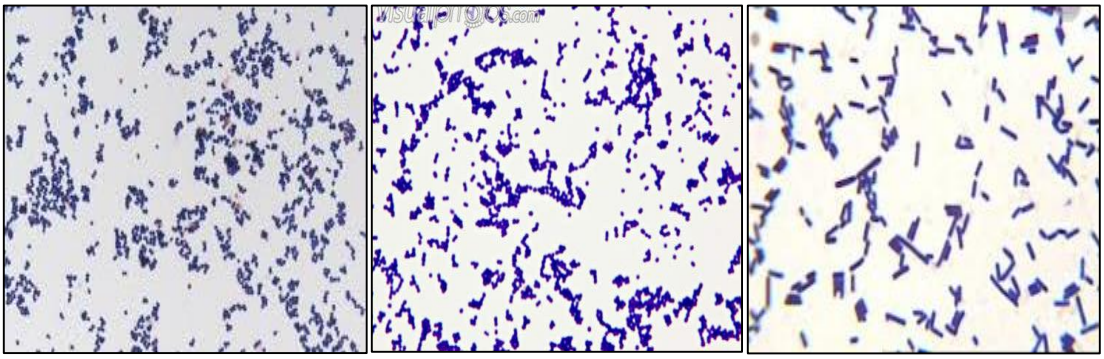
๔) หยดสี Gram iodine ตั้งทิ้งไว้ ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ

๕) ล้างสีด้วย ๙๕% alcohol แล้วล้างออกด้วยน้ำ

๖) หยดสี Safranin ๑๕-๒๐ วินาที ล้างสีด้วยน้ำแล้วปล่อยให้แห้ง

๗) นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย ๑๐๐x โดยใช้ immersion oil

๘) ตรวจดูลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของแบคทีเรีย ในกรณีที่แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ดังภาพ



ภาพที่ ๔ ภาพแสดงการติดสีของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดต่างๆ

๓.๒.๔ วิธีการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

วิธีการทดสอบลักษณะความต้องการอาหาร และลักษณะที่แสดงออกทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกนั้น ต้องใช้การทดสอบที่แตกต่างกันออกไปหลายวิธี เพื่อคัดแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกดังนี้

(๑) วิธีการทดสอบ catalase test

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้าง enzyme catalase ซึ่งแบคทีเรียสร้างขึ้นมาเพื่อย่อยสลาย H_2O_2 ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยขั้นตอนนี้จะใช้แยกเชื้อกลุ่ม ***Staphylococcus*** ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase positive ออกจาก ***Streptococcus*** ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase negative หรือจะใช้ในการคัดแยกเชื้อ ***Neisseria gonorrhoeae*** ซึ่งให้ผลการทดสอบ catalase positive ออกจาก *Neisseria meningitides*

วิธีการทดสอบ

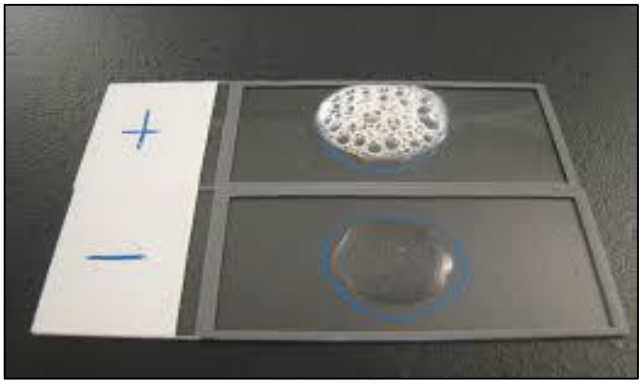
๑. เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อแตะลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด

๒. หยด H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บน slide ๑ หยด

การอ่านผล

Positive : มีฟองเกิดขึ้นทันที

Negative : ไม่มีฟองเกิดขึ้น



ภาพที่ ๕ ภาพแสดงการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อกับสารละลาย๓% Hydrogen peroxide (H_2O_2)

(๒) วิธีการทดสอบ Coagulase Test

หลักการ

เป็นการทดสอบความสามารถในการผลิต coagulase enzyme เพื่อแยกเชื้อ ***Staphylococcus aureus*** ที่สามารถผลิต coagulase enzyme ออกจาก ***Staphylococcus*** ชนิดอื่นๆนี้มี ๒ รูปแบบคือ

๑. Bound coagulase เป็น enzyme ที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ (ทดสอบได้โดยวิธี slide test) Bound coagulase นี้มีผลทำให้ fibrinogen ใน serum เปลี่ยนเป็น fibrin ทำให้ serum เกิดการแข็งตัว (clot)

๒. Free coagulase เป็น enzyme ที่ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ (ทดสอบได้ด้วยวิธี tube test) coagulase จะจับกับ coagulase reacting factor (CRF) เป็นสารประกอบที่เรียกว่า Coagulase CRF ซึ่งแตกต่างจาก Thrombin และสารประกอบนี้สามารถเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ได้

วิธีการทดสอบ

ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจใช้ Trypticase soy broth กับ plasma ในอัตราส่วน ๑:๑ (หรืออาจจะใช้ plasma อย่างเดียวไม่ผสม Trypticase soy broth ก็ได้) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส สังเกตุผลทุก ๓๐ นาที โดยเอียงหลอดดูว่ามีการแข็งตัวของ พลาสมา หรือไม่ส่วนใหญ่มักให้ผล positive ภายใน ๔ ชั่วโมง ถ้ายังไม่พบการแข็งตัวของพลาสมาให้บ่มจนครบ ๘-๒๔ ชั่วโมง

การอ่านผล

Positive : เกิดการแข็งตัวของพลาสมา

Negative : ไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมา

(๓) วิธีการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อกลุ่ม *Streptococcus*

หลักการ

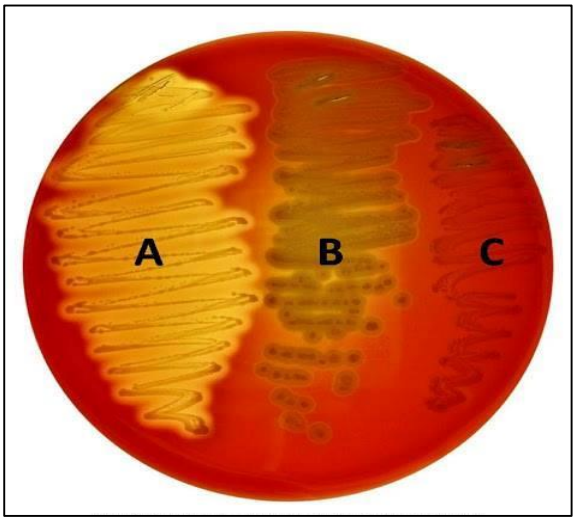
เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือรี แบ่งตัวในแนวเดียว ทำให้มักเห็นเป็นเส้นสายยาวต่อกัน เมื่อย้อมด้วยสีและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างรงควัตถุ สร้างแคปซูล เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดผสมอยู่ โคโลนีขนาดเล็ก กลม ใส ไม่มีสี ใช้ลักษณะในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการทดสอบ

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีของแบคทีเรียที่จะทดสอบไป streak บนอาหาร blood agar ถ้าเกิดมีวงกลมใสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้

การอ่านผล

- Alpha hemolysis ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน ทำให้เห็นรอบๆ โคโลนีเป็นสีเขียว เนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกย่อยสลายไม่หมด
- Beta hemolysis เชื้อจะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้รอบๆโคโลนีบนอาหาร Blood agar มีลักษณะใส เนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ และเชื้อกลุ่มนี้มักทำให้เกิดโรคในคน และ ***Streptococcus Group B*** ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้
- Gramma hemolysis ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงเมื่อเจริญบนอาหาร



ภาพที่ ๖ ภาพแสดงตัวอย่างเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแบคทีเรีย
A. Beta hemolysis B. Alpha hemolysis C. Gramma hemolysis

(๔) วิธีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial susceptibility testing)

หลักการ

เป็นการศึกษาภายนอกร่างกายที่ใช้กันมากที่สุด เพื่อตรวจหายาที่มีความไวในการตอบสนองต่อการรักษาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค และตรวจหายาที่ดื้อต่อการรักษา เพื่อช่วยเป็นแนวทางหรือข้อมูลในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ

ให้เหมาะกับผู้ป่วย และมีข้อควรพิจารณาคือบางครั้งผลของความไวต่อยาที่ได้จากการทดสอบอาจจะไม่สอดคล้องกับผลลัพธ์ทางคลินิก ซึ่งการทดสอบยาปฏิชีวนะนี้ยังสามารถบ่งบอกถึงคุณสมบัติของเชื้อบางชนิดได้ เช่นเชื้อ ***Streptococcus pneumonia*** มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด Optochin เชื้อ ***Streptococcus pyogenase*** มีความไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด Bacitracin เป็นต้น

วิธีการทดสอบ

๑. นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา ๑ โคโลนี แตะลงในอาหาร trypticase soy broth ผสมให้เข้ากันดีโดยปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer

๒. บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๓-๔ ชั่วโมง

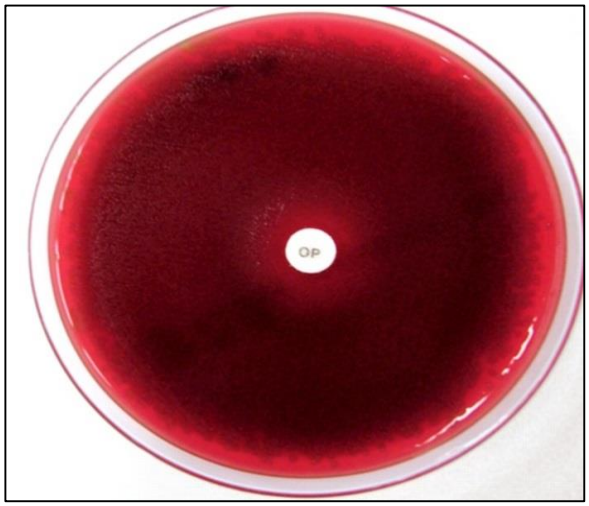
๓. เมื่อครบกำหนดแล้วใช้ swab sterile จุ่มเชื้อที่อยู่ในอาหาร trypticase soy broth แล้วนำมาเกลี่ย (spread) บนอาหาร Blood agar ให้ทั่วและสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ประมาณ ๕ นาที

๔. วางแผ่นยา (antibiotic disc) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ระยะห่างระหว่างแผ่น disc ให้เหมาะสมเพื่อความสะดวกในการอ่านผล กดแผ่นยาเบาๆ บนอาหารวุ้น ทิ้งไว้ให้แห้ง

๕. บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง แล้วอ่านผลการทดลอง

การอ่านผล

- Susceptible, sensitive (S) หมายถึง ยาที่ให้ในขนาดหรือความเข้มข้นปกติหรือขนาดที่แนะนำแล้วมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อได้ จะสังเกตุเห็นโซนใสรอบ disk ยา



ภาพที่ ๗ ภาพแสดงความสามารถของยา ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Susceptible)

- Intermediate (I) หมายถึง ยาน่าจะใช้ในการรักษาการติดเชื้อได้ ถ้าใช้ยาขนาดสูงหรือใช้รักษาการติดเชื้อทีอวัยวะที่ยามีความเข้มข้นสูง ยามีแนวโน้มจะมีประ สิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อต่ำกว่าการใช้ยากรณีที่ผลการทดสอบเป็น susceptible

- Resistant (R) หมายถึง ยาที่ไม่น่าจะใช้ได้ผลในการรักษา ยามีผลการศึกษาทางคลินิกบ่งบอกว่าเกิดการรักษาล้มเหลวเมื่อมีการใช้ยาดังกล่าว จะสังเกตุเห็นว่าเชื้อสามารถเกิดขึ้นได้ และไม่พบโซนใสรอบ disk ยา

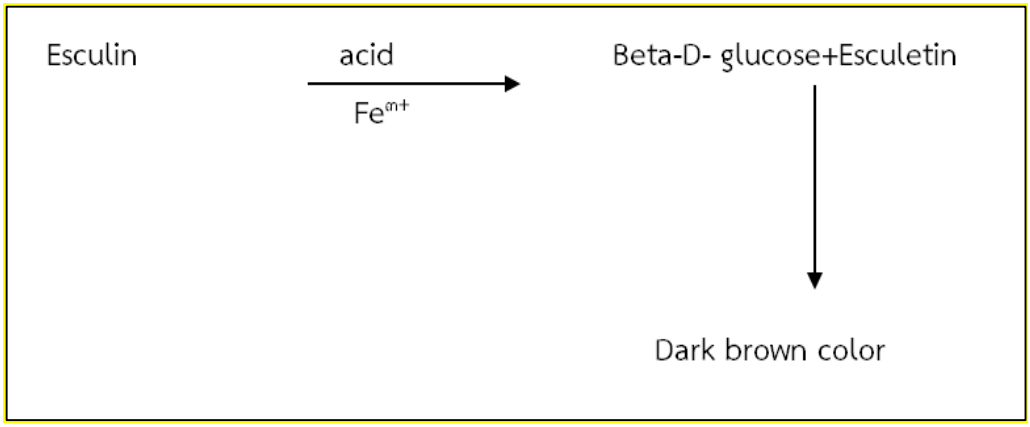
ภาพที่ ๘ แสดงความสามารถของยา ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ (Resistant)

ภาพที่ ๙ ภาพแสดงการเปรียบเทียบความสามารถของยาระหว่าง Susceptible และ Resistant

(๕) วิธีการทดสอบ Bile esculin

หลักการ

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ทนน้ำดีเข้มข้น ๑๐-๔๐% และเกิดปฏิกิริยาทำให้ bile esculin เปลี่ยนเป็นสีดำดังสมการ



วิธีการทดสอบ

๑. เตรียมอาหาร bile esculin slant tube

๒. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร bile esculin slant agar

การอ่านผล

Positive : อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ

Negative : สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

ภาพที่ ๑๐ แสดงผลการทดลอง Bile esculin agar test

(๖) วิธีการทดสอบ ๖.๕% NaCl

หลักการ

เนื่องจากอาหารนี้มีความเข้มข้นของ NaCl ถึง ๖.๕% เชื้อที่สามารถทนต่อความเข้มข้นนี้จึงจะเจริญได้ เพื่อให้การทดสอบง่ายขึ้นจึงใช้ Indicator เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนสีชัดเจน โดยเชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะไปเปลี่ยนสี Bromcresol purple จากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง

วิธีการทดสอบ

๑. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีที่ต้องการทดสอบลงใน อาหาร ๖.๕% NaCl

๒. บ่มที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง

การอ่านผล

Positive : อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Negative : สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

ภาพที่ ๑๑ แสดงผลการทดลอง ๖.๕% NaCl (broth)

(๗) วิธีการทดสอบ CAMP test

หลักการ

เป็นการทดสอบเพื่อแยก Group B streptococci โดยอาศัยคุณสมบัติพิเศษของเชื้อชนิดนี้คือสามารถให้ CAMP factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถแพร่กระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็ว ทนต่อความร้อน และสามารถทำปฏิกิริยาเสริมฤทธิ์กับ beta toxin จาก ***Staphylococcus aureus*** ซึ่งมีผลให้เม็ดเลือดแดงแกะและเม็ดเลือดแดงวัวแตกอย่างรวดเร็ว (ไม่เกิดกับเม็ดเลือดแดงคน ม้า หรือกระต่าย)

วิธีการทดสอบ

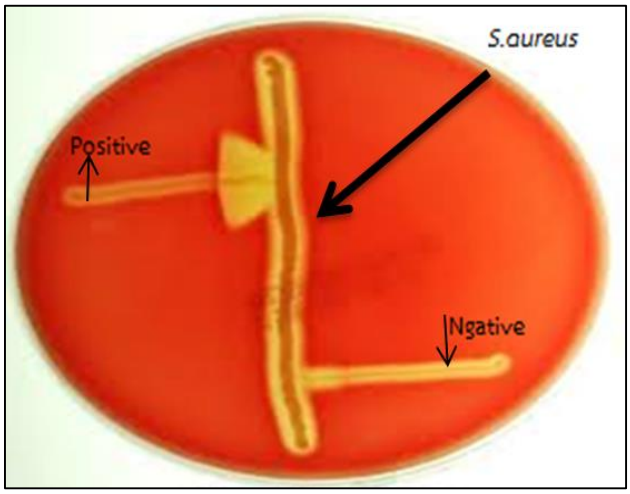
๑. ขีดเชื้อ ***Staphylococcus aureus*** สายพันธุ์ที่ให้ Beta toxin เป็นเส้นตรง ตรงกลาง Blood agar plate

๒. ขีดเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยให้ตั้งฉากกับแนวของ ***Staphylococcus aureus*** นำไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส อ่านผลที่ ๒๔ ชั่วโมง

การอ่านผล

Positive : เกิดบริเวณที่ทำลายเม็ดเลือดแดงระหว่าง ***Staphylococcus aureus*** กับเชื้อที่ทดสอบเป็นรูปลูกศร ซึ่งหมายถึงเชื้อที่ทดสอบน่าจะเป็น Group B streptococci

Negative : ไม่มีบริเวณการทำลายเม็ดเลือดแดง หรือมีแต่ไม่เป็นรูปลูกศร



ภาพที่ ๑๒ แสดงผลการทดลอง CAMP test Positive และ CAMP test Negative

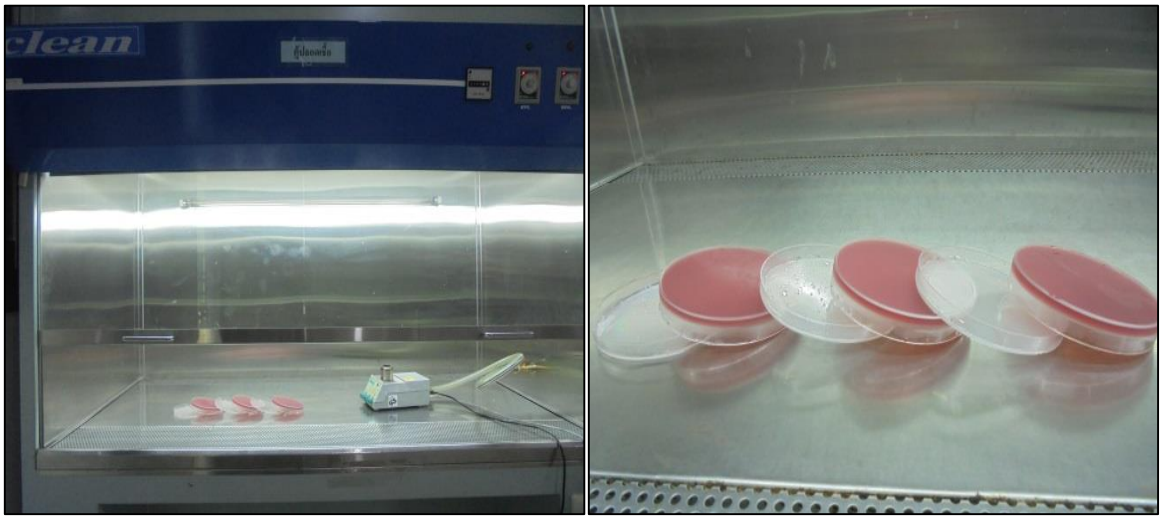
๓.๓ เงื่อนไข/ข้อสังเกตุ/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน

๓.๓.๑ เลือดที่ใช้ในการทดลองเป็นเลือดของมนุษย์ ขอความอนุเคราะห์มาจากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ดังนั้นในการปฏิบัติงานทุกครั้งจึงควรสวมถุงมือเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากเลือดที่รับมา

๓.๓.๒ ในการเตรียม blood agar ผู้เตรียมจะต้องใจเย็นๆ รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นตัวลงให้มากที่สุด แต่ไม่แข็งประมาณ ๕๐ องศาเซลเซียส แล้วค่อยผสมเลือดลงไป จะทำให้ได้เพลทอาหารที่มีสีแดงสด และในการทดลองจะทำให้มองเห็นการสลายของเม็ดเลือดแดงได้ชัดเจนขึ้น

๓.๓.๓ ก่อนการเตรียมการวินิจฉัยทุกครั้ง อาหารที่อยู่ในเพลทต้องตากให้แห้ง ประมาณ ๑๕ นาที หรือสังเกตุว่าไม่มีหยดน้ำเกาะอยู่ที่พื้นผิวของอาหาร

๓.๓.๔ ในการเขี่ยเชื้อจากอาหารที่มีเลือดผสมอยู่ ควรแตะเฉพาะโคโลนีของเชื้อมาทดสอบ อย่าให้โดนอาหารที่มีเลือดผสม เพราะจะทำให้เกิดบวกปลอมได้ (เอนไซม์ Catalase พบได้ในเม็ดเลือดแดง)



ภาพที่ ๑๓ แสดงตัวอย่างการตากเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ

หมายเหตุ ในการตากเพลทซ้อนกัน ให้ประมาณระยะห่างระหว่างฝาเพลทกับก้นเพลทให้เหมาะสม เพราะถ้าชิดกันมากเกินไป อาจทำให้ฝาเพลทที่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้

๓.๓.๕ ข้อควรรู้ในการย้อมแกรมคือ

- เซลล์ปกติ (vegetative cell) เท่านั้นที่ติดสีแกรมบวกหรือแกรมลบ แต่ถ้าเซลล์เกิดแตกขึ้นมาจะติดเฉพาะสีแกรมลบเท่านั้น
- การย้อมแกรมต้องใช้ crystal violet และสารละลายไอโอดีนเสมอ
- แบคทีเรียเท่านั้นที่ให้ผลต่างกันในการย้อมสีแกรม แต่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆจะติดสีย้อมแกรมอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น เช่น เซลล์ยีสต์จะติดสีแกรมบวก
- การย้อมสีแกรมสามารถเกิดข้อผิดพลาดเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแกรมลบได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแบคทีเรียแกรมลบไปเป็นแกรมบวกได้
- ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วย Safranin (สีแดง) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบซึ่งเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้จึงเห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง ๒ กลุ่มอย่างชัดเจน

๓.๓.๖ ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารสำเร็จรูปให้อ่านฉลากของสารอาหารนั้นให้ละเอียดก่อนลงมือทำปฏิบัติการ

บทที่ ๔
เทคนิคในการปฏิบัติงาน

เทคนิคในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม มีความหลากหลายมาก ขึ้นอยู่กับว่าผู้ปฏิบัติงานต้องการคัดแยกเชื้อจากอะไร เชื้อที่เริ่มต้นเป็นเชื้อที่ถูกคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม จากอาหาร หรือเป็นเชื้อที่ถูกคัดแยกเรียบร้อยแล้วนำมายืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเทคนิคการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีอยู่ภายในห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข ซึ่งเป็นเชื้อที่มีอยู่แล้ว แต่ในบางครั้งเกิดการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ทำให้ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องคัดแยกเชื้ออีกครั้งหนึ่ง หรือแม้ว่าจะไม่มีการปนเปื้อนเกิดขึ้น ผู้ปฏิบัติงานก็ยังต้องยืนยัน ลักษณะสัณฐานวิทยา ความต้องการอาหาร และความสามารถทางชีวเคมีของเชื้อก่อนการทำปฏิบัติการทุกครั้ง

๔.๑ แผนกลยุทธในการปฏิบัติงาน

กลยุทธในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวมชนิดกลมนั้น จะต้องนำความรู้เกี่ยวกับการย้อมสี (strining methods) การแยกเชื้อ (isolation techniques) อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) วิธีการทางชีวเคมี (biochemical test) และรูปร่างลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัว นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในการเรียนปฏิบัติการนั้น มีทั้งหมด ๘ ชนิด คือ

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Streptococcus pyogenese*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pneumonia*
- *Streptococcus viridance*
- *Enterococcus faecalis*

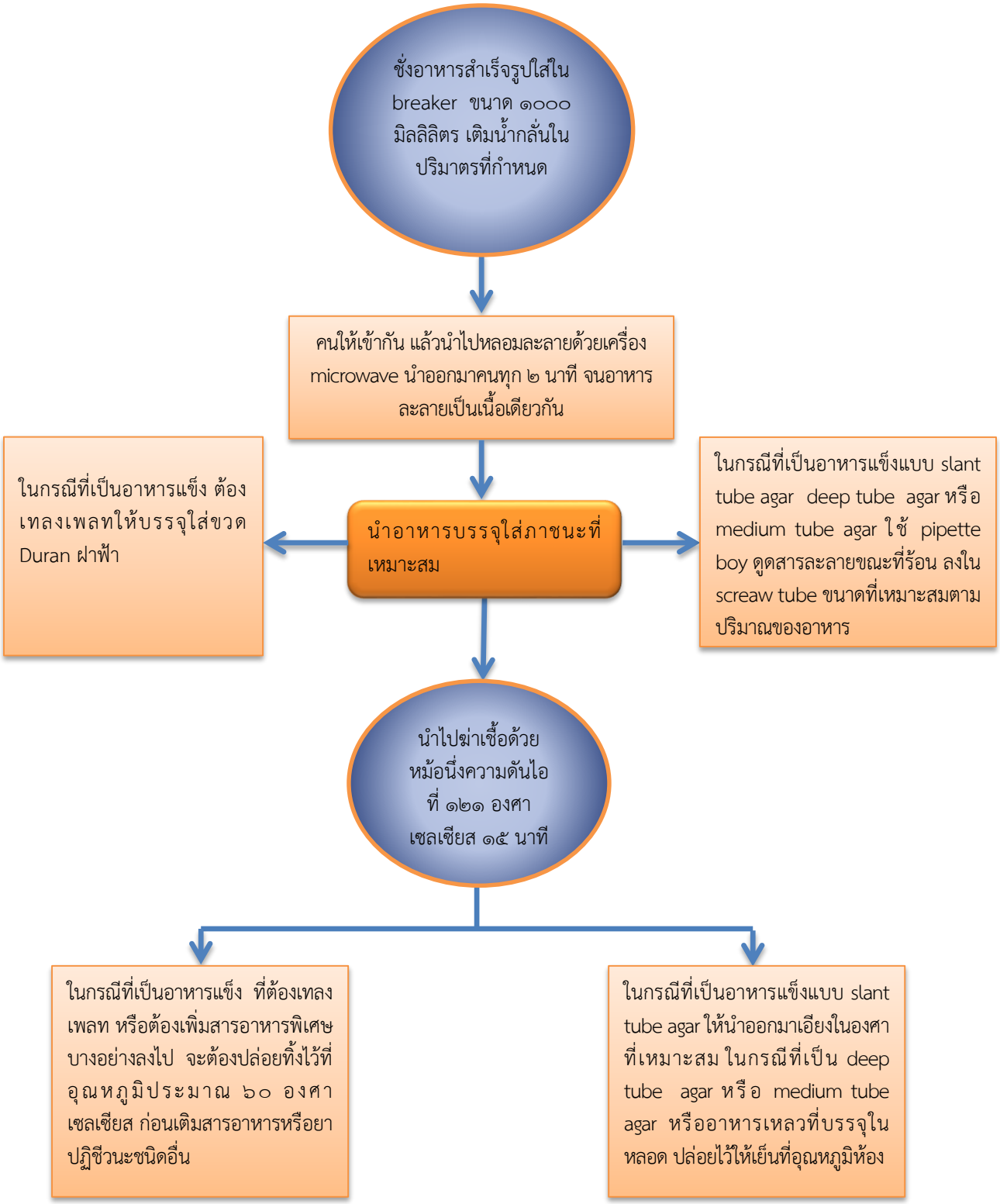
๔.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จะมีขั้นตอนการวิเคราะห์และคัดแยกเชื้อ ๔ ขั้นตอนดังนี้

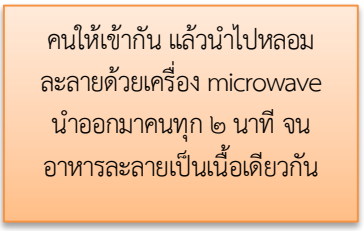
- ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์
- ขั้นตอนการสังเกตุลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม (Gram’s staining)
- ขั้นตอนการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

๔.๒.๑ ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

๔.๒.๑.๑ กระบวนการ



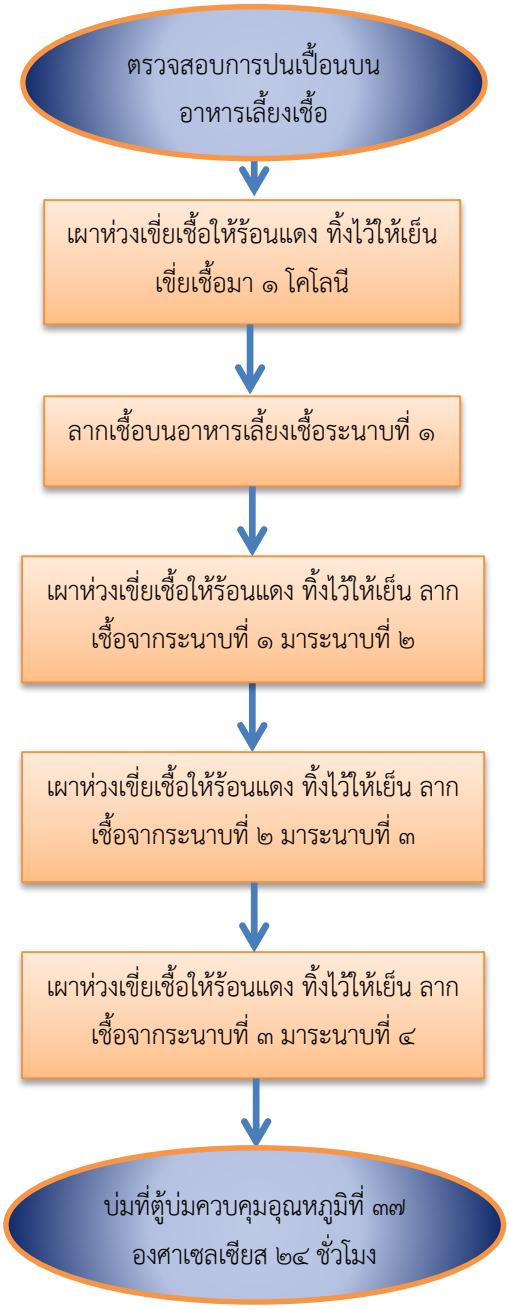
๔.๒.๒.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอน
๑.		ในห้องปฏิบัติการวิทยาลัยแพทยศาสตร์นั้น จะใช้อาหารสำเร็จรูปเป็นหลักในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกประเภท ในการเตรียมจะดำเนินการชั่งอาหารลงใน breaker ขนาด ๑๐๐๐ มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปครึ่งหนึ่งของปริมาตรที่ต้องการ
๒.		คนสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันไม่จับกันเป็นก้อน แล้วนำเอาไปหลอมละลายด้วยเครื่อง microwave นำออกมาคนทุก ๒ นาที จนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วค่อยๆเติมน้ำลงไปจนได้ปริมาตรที่ต้องการ นำเข้าไมโครเวฟจนอาหารร้อน แล้วนำออกมาคนให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง
๓.		ในกรณีที่เป็นอาหารแข็งแบบ slant tube agar deep tube agar หรือ medium tube agar ใช้ pipette boy ดูดสารละลายขณะที่ร้อน ลงใน screaw tube ขนาดที่เหมาะสมตามปริมาณของอาหาร ในกรณีที่เป็นอาหารแข็งต้องเทลงเพลท ให้บรรจุใส่ขวด Duran ฝาฟ้าขนาดตามความเหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณที่เตรียม
๔.		การนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ๑๕ นาที เป็นขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterile technique) อีกวิธีการหนึ่งหลังจากครบเวลาที่กำหนดแล้วคัดแยกประเภทอาหารดังนี้ ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง ที่ต้องเทลงเพลท หรือต้องเพิ่มสารอาหารพิเศษบางอย่างลงไป จะต้องปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ ๖๐ องศาเซลเซียส ก่อนเติมสารอาหารหรือยาปฏิชีวนะชนิดอื่น แล้วค่อยเทลงเพลทที่ปราศจากเชื้อ ในกรณีที่เป็นอาหารแข็งแบบ slant tube agar ให้นำออกมาเอียงในองศาที่เหมาะสม

		ในกรณีที่เป็น deep tube agar หรือ medium tube agar หรืออาหารเหลวที่บรรจุในหลอด ปล่อยไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

๔.๒.๒ ขั้นตอนการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Cross streak

๔.๒.๒.๑ กระบวนการ

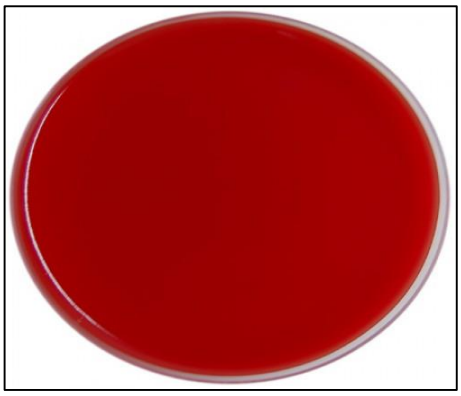


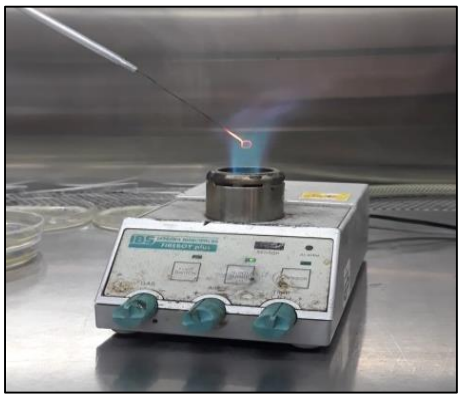
๔.๒.๒.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

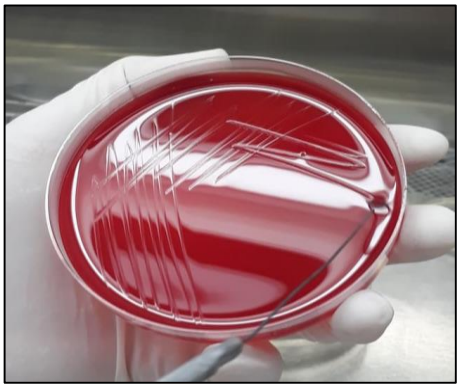
ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอน
๑.		ก่อนที่จะทำปฏิบัติการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ผู้ปฏิบัติงานต้องตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นก่อนเริ่มทำการปฏิบัติการทุกครั้ง โดยการวางอาหารที่จะนำไปทดสอบในขั้นตอนต่างๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง หากมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนอาหารจะเปลี่ยนสี หรือมีโคโลนีของเชื้ออื่นเกิดขึ้นบนเพลททดลอง
๒.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นเขี่ยเชื้อมา ๑ โคโลนี	การเผาห่วงเขี่ยเชื้อ เป็นขั้นตอนการทำลายเชื้อ จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการบนห่วงเขี่ยเชื้อ หรือเป็นการทำความสะอาดห่วงเขี่ยเชื้อโดยวิธีการ Sterile technique หลังจากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อมา ๑ โคโลนี
๓.	ลากเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑	แตะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วลากเชื้อสลับเป็นฟันปลาแบบถี่ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑
๔.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๑ มาระนาบที่ ๒	เผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น (ห้ามนำห่วงเขี่ยเชื้อไปเขี่ยเอาโคโลนีบนเพลทมาซ้ำอีกเด็ดขาด) แล้วลากเชื้อสลับเป็นฟันปลาแบบถี่ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑ มาระนาบที่ ๒
๕.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๒ มาระนาบที่ ๓	เผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น (ห้ามนำห่วงเขี่ยเชื้อไปเขี่ยเอาโคโลนีบนเพลทมาซ้ำอีกเด็ดขาด) แล้วลากเชื้อสลับเป็นฟันปลาแบบถี่ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๒ มาระนาบที่ ๓
๖.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๓ มาระนาบที่ ๔	เผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น (ห้ามนำห่วงเขี่ยเชื้อไปเขี่ยเอาโคโลนีบนเพลทมาซ้ำอีกเด็ดขาด) แล้วลากเชื้อสลับเป็นฟันปลาแบบถี่ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๓ มาระนาบที่ ๔

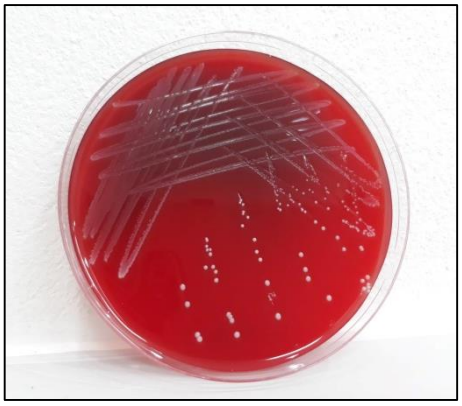
๗.	บ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง	ขั้นตอนสุดท้าย นำเชื้อไปบ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาปรับเป็น infinity (∞) เช็คผลการทดลองที่ ๒๔ ชั่วโมง

๔.๒.๒.๓ ขั้นตอนการปฏิบัติงานแสดงเป็นรูปภาพ

ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอนโดยรูปภาพ
๑.	ตรวจสอบการปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	 **ภาพที่ ๑๔** แสดงภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ **ภาพที่ ๑๕** แสดงภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

๒.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็นเขี่ยเชื้อมา ๑ โคโลนี	 **ภาพที่ ๑๖** แสดงภาพการเผาห่วงเขี่ยเชื้อ **ภาพที่ ๑๗** แสดงภาพวิธีการเขี่ยเชื้อ
๓.	ลากเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑	 **ภาพที่ ๑๘** แสดงภาพวิธีการลากเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อระนาบที่ ๑

๔.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๑ มาระนาบที่ ๒	 **ภาพที่ ๑๙** แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๑ มาระนาบที่ ๒
๕.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๒ มาระนาบที่ ๓	 **ภาพที่ ๒๐** แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๒ มาระนาบที่ ๓
๖.	เผาห่วงเขี่ยเชื้อให้ร้อนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ลากเชื้อจากระนาบที่ ๓ มาระนาบที่ ๔	 **ภาพที่ ๒๑** แสดงภาพวิธีการลากเชื้อจากระนาบที่ ๓ มาระนาบที่ ๔

๗.	บ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส ๒๔ ชั่วโมง	 **ภาพที่ ๒๒** แสดงการตั้งค่าตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส  **ภาพที่ ๒๓** แสดงภาพของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อบ่มครบ ๒๔ ชั่วโมง

๔.๒.๓ ขั้นตอนการสังเกตุลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม (Gram's staining)

๔.๒.๓.๑ กระบวนการ

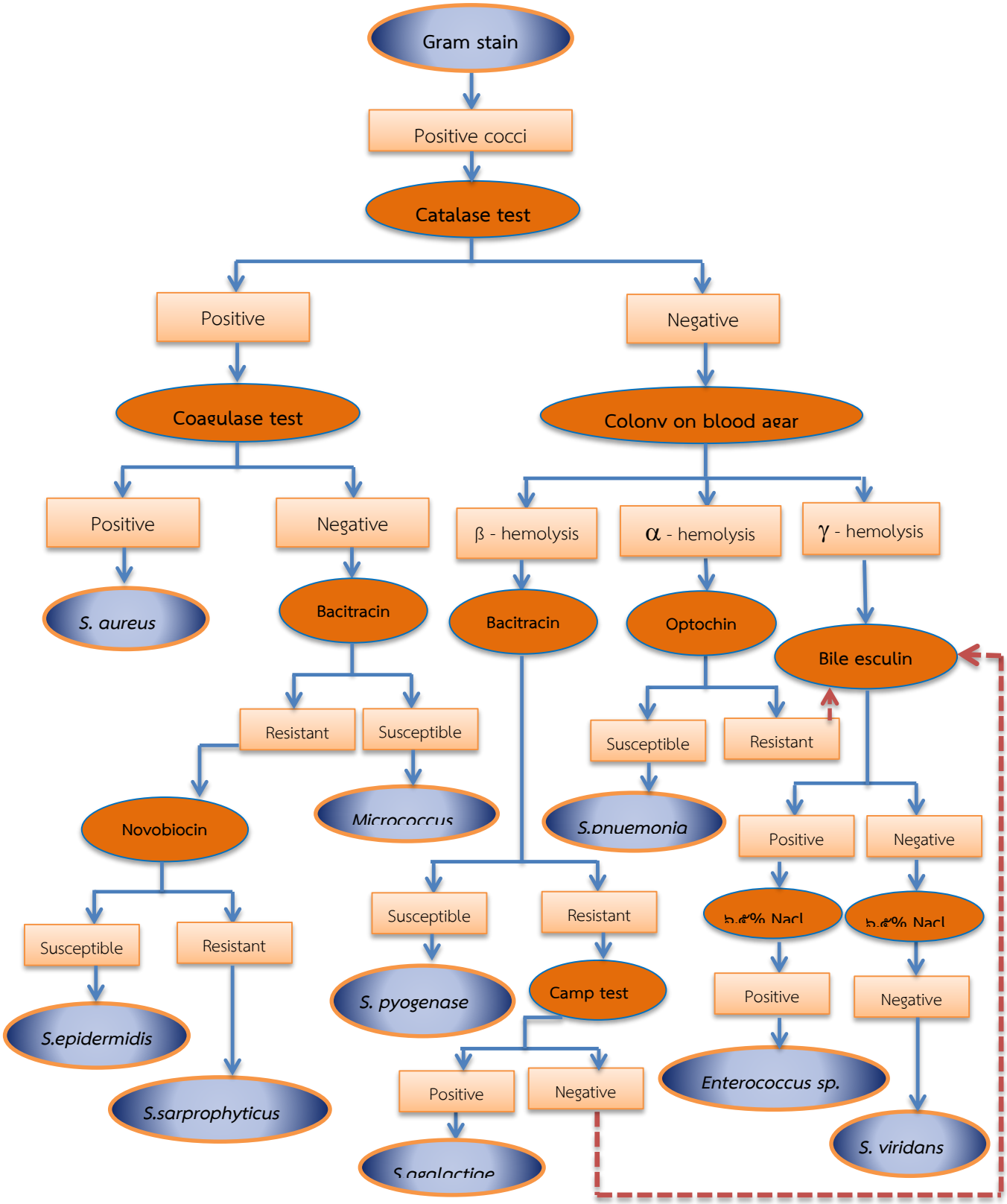
๔.๒.๓.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอน
๑.		เป็นขั้นตอนการทำความสะอาดสไลด์ เป็นเทคนิคเพื่อช่วยให้เชื้อกระจายตัวได้ดีบนแผ่นสไลด์ ไม่กระจุกกันเป็นกลุ่มก้อน
๒.	เตรียมเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ และFixative	หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ๑ หยด บน glass slide โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อลงไปละลายแล้วเกลี่ยให้เป็นวงกว้างๆ บางๆ ประมาณ ๑ เหรียญบาทเล็ก รอให้ slide แห้ง แล้ว Fix slide ด้วยไฟไปมา ๓ ครั้ง
๓.	หยดสี Crystal violet ตั้งทิ้งไว้ ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ	หยดสีคริสทัลไวโอเลตลงบนแผ่นสไลด์ โดยให้ท่วมรอย smear
๔.	หยดสี Gram iodine ตั้งทิ้งไว้ ๑ นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ	เป็นขั้นตอนการตรึงสีคริสทัลไวโอเลตด้วย Mordanting agent ได้แก่ Gram's Iodine จะเกิดเป็นสารประกอบ complex ที่เรียกว่า Crystal Violet Iodine complex ติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย
๕.	ล้างสีด้วย ๙๕% alcohol แล้ว ล้างออกด้วยน้ำ	เป็นขั้นตอนล้างสี crystal Iodine complex ออกจากผนังเซลล์ **แบคทีเรียแกรมบวกจะ**ติดสีม่วงของคริสทัลไวโอเลตได้เพราะในผนังเซลล์มีเปบทิโดไกลแคนมาก จะช่วยให้แบคทีเรียแกรมบวก มีความสามารถที่จะทนต่อ decolorizer อีกทั้งยังทำให้ pore size ใน peptidoglycan มีขนาดลดลงด้วย จึงทำให้แบคทีเรียแกรมบวก ยังคงรักษา Crystal Iodine complex ทำให้ย้อมแกรมแล้วติดสีม่วง

๖.	หยดสี Safranin ๓๐ วินาที ล้างสีด้วยน้ำแล้วปล่อยให้แห้ง	**แบคทีเรียแกรมลบ** จะติดสีแดงของซาฟรานินหรือฟุกชีน (Sarfanin) เพราะในผนังเซลล์มีเปบทิโดไกลแคนน้อย หลังจากการล้างสี (Decolorization) ด้วย decolorizer agent เช่น ๙๕% alcohol คริสทัลไวโอเลตจะถูกชะล้างออกได้โดยง่าย เนื่องจากยังคงมี pore size ขนาดใหญ่กว่าในแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้ผนังเซลล์ติดสีแดงของน้ำยาซาฟรานีน ในขั้นตอนนี้สามารถซับด้วยกระดาษทิชชูได้ แต่ห้ามเช็ดถูไปมาบนแผ่นสไลด์เด็ดขาดเพราะจะทำให้เชื้อที่ย้อมหลุดออกมา
๗.	สังเกตุผลการทดลอง	นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย ๑๐๐x ตรวจดูลักษณะการติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของแบคทีเรีย ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน

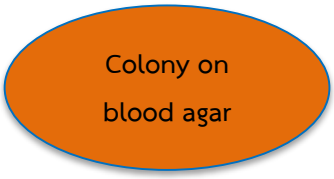
๔.๒.๔ ขั้นตอนการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี (biochemical characteristics)

๔.๒.๔.๑ กระบวนการ



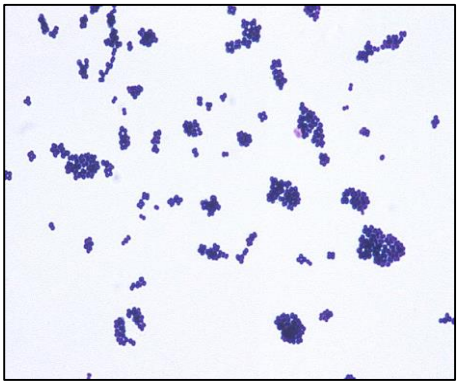
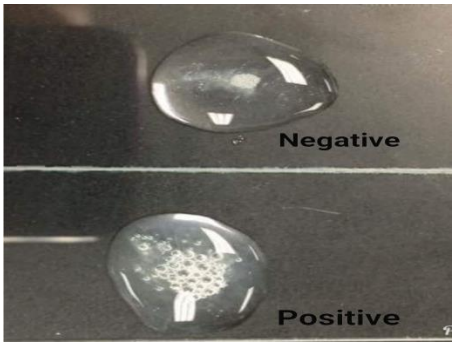
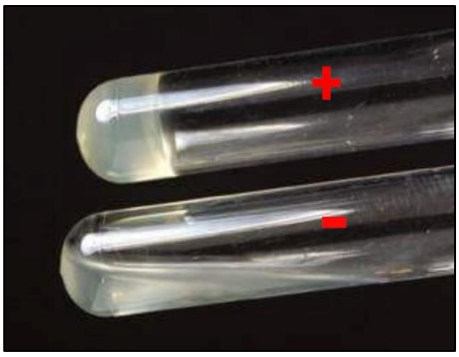
๔.๒.๔.๒ ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอน
๑.	Gram stain	ก่อนที่จะนำเชื้อมาทดสอบวิธีการทางชีวเคมีตามกระบวนการ ต้องนำเชื้อไปทำการย้อมสีแกรมเสียก่อน และเชื้อที่จะนำมาวิเคราะห์ ต้องเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ที่ติดสีม่วงของคริสทัลไวโอเลต
๒.	Catalase test	นำเชื้อที่อยู่บนเพลทอาหาร Blood agar มาทดสอบ Catalase โดยหยดน้ำยา ๓%H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ สังเกตุการเกิดฟองในน้ำยา ซึ่งขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนสำคัญในการคัดแยกเชื้อในกลุ่ม ***Staphylococcus sp.***และ ***Streptococcus sp.*** ออกจากกัน
๓.	Coagulase	หลังจากหยดน้ำยา ๓%H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วเกิดฟองขึ้น แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบนี้จัดอยู่ในกลุ่ม ***Staphylococcus sp.*** ให้นำมาทดสอบ coagulase โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ใส่ในพลาสมาที่บรรจุในหลอดแก้วปริมาณ ๑ มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส อ่านผลที่ ๔ ชั่วโมง ๘ ชั่วโมง และ ๒๔ ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวในช่วงระยะเวลาใดเวลาหนึ่งให้อ่านผลเป็น Positive แสดงว่าเชื้อนั้นเป็นเชื้อ ***Staphylococcus aureus*** หากพลาสมาไม่แข็งตัวให้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป
๔.	Bacitracin ๖.๕% Nacl	หลังจากทดสอบพลาสมา อ่านผลจนครบทุกระยะเวลา ผลปรากฏว่าพลาสมาไม่แข็งตัว ให้อ่านผลเป็น Negative แล้วนำไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin หากเชื้อจุลินทรีย์เกิดเคลียร์โซนใสรอบดิสย์ยา Bacitracin ให้อ่านผลเป็น Susceptible นั่นคือเชื้อไม่สามารถทนต่อยา Bacitracin ได้ แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Micrococcus sp.***

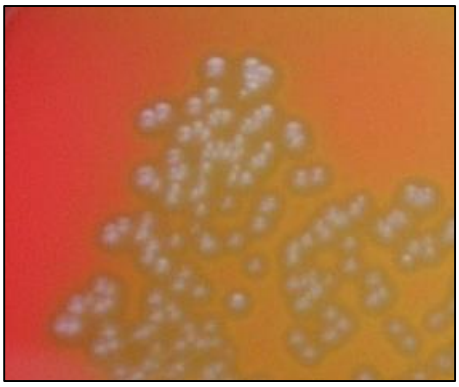
๕.		เมื่อนำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ผลปรากฏว่าไม่พบเคลียร์โซนรอบดิสย์ยา ให้อ่านผลเป็น Resistant นั้นคือเชื้อสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ได้ ให้ทำการทดสอบยาปฏิชีวนะ Novobiocin ต่อไป หากพบว่าเชื้อยังสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin ได้ ให้อ่านผลเป็น Resistant แสดงว่าเชื้อนั้นคือ ***Staphylococcus sarprophyticus*** และหากเชื้อจุลินทรีย์เกิดเคลียร์โซนใสรอบดิสย์ยา Novobiocin ให้อ่านผลเป็น Susceptible นั่นคือเชื้อไม่สามารถทนต่อยา Novobiocin ได้ แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Staphylococcus epidermidis***
๖.		หลังจากหยดน้ำยา ๓%H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วไม่เกิดฟองขึ้น แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบนี้จัดอยู่ในกลุ่ม ***Streptococcus sp.*** ให้สังเกตการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อจุลินทรีย์ว่าเป็นแบบ β - hemolysis α - hemolysis หรือ γ - hemolysis หากสังเกตุเรียบร้อยให้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป
๗.		หากสังเกตุพบว่า การย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์เป็นแบบ γ - hemolysis คือเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ให้นำเชื้อมาทดสอบบนอาหาร Bile esculin slant และ ๖.๕%$NaCl_2$ หากพบว่า Bile esculin slant เปลี่ยนเป็นสีดำ และ ๖.๕%$NaCl_2$ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ให้อ่านผลเป็น Positive แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Enterococcus sp.*** แต่ถ้าหากพบว่า Bile esculin slant และ ๖.๕% $NaCl_2$ ไม่เปลี่ยนแปลง ให้อ่านผลเป็น Negative แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Streptococcus viridances***

๘.		หากสังเกตุพบว่า การย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์เป็นแบบ α - hemolysis คือเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้บางส่วน ให้นำเชื้อไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Optochin หากพบว่าเชื้อจุลินทรีย์เกิดเคลียร์โซนใสรอบดิสย์ยา Optochin ให้อ่านผลเป็น Susceptible นั่นคือเชื้อไม่สามารถทนต่อยา Optochin ได้ แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Streptococcus pnuemoniae*** หากพบว่าเชื้อยังสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะ Optochin ได้ ให้อ่านผลเป็น Resistant แสดงว่าเชื้อดังกล่าวอาจจะเป็น ***Enterococcus sp.*** หรือ ***Streptococcus viridances*** ก็ได้ ให้นำไปทดสอบด้วย Bile esculin slant และ ๖.๕% $NaCl_2$ และอ่านผลต่อไป
๙.		หากสังเกตุพบว่า การย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์เป็นแบบ β - hemolysis คือเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์ ให้นำเชื้อไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin หากพบว่าเชื้อจุลินทรีย์เกิดเคลียร์โซนใสรอบดิสย์ยา Bacitracin ให้อ่านผลเป็น Susceptible นั่นคือเชื้อไม่สามารถทนต่อยา Bacitracin ได้ แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวคือเชื้อ ***Streptococcus pyogenase*** หากพบว่าเชื้อยังสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ได้ ให้ทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป
๑๐.		หากสังเกตุพบว่าเชื้อยังสามารถทนทานต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin ได้ ให้ทำการทดสอบ Camp test หากพบ ว่าเกิดเคลียร์โซนเป็นรูปลูกศรให้อ่านผลเป็น Positive แสดงว่าเชื้อนั้นคือ ***Streptococcus agalactiae*** หากไม่พบการเปลี่ยนแปลงให้อ่านผลเป็น Negative แสดงว่าเชื้อดังกล่าวอาจจะเป็น ***Enterococcus sp.*** หรือ ***Streptococcus viridances*** ก็ได้ ให้นำไปทดสอบด้วย Bile esculin slant และ ๖.๕% $NaCl_2$ และอ่านผลต่อไป

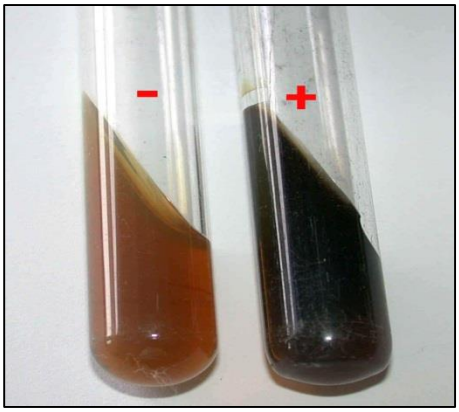
๔.๒.๔.๓ ขั้นตอนการปฏิบัติงานแสดงเป็นรูปภาพ

ขั้นตอน	กระบวนการ	อธิบายขั้นตอนโดยรูปภาพ
๑.	Gram stain	 **ภาพที่ ๒๔** แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมที่ถูกย้อมด้วยวิธี Gram stain
๒.	Catalase test	 **ภาพที่ ๒๕** แสดงการเกิดปฏิกิยาในการทดสอบ Catalase test ด้วย H_2O_2
๓.	Coagulase	 **ภาพที่ ๒๖** แสดงการเกิดปฏิกิยาในการทดสอบ Coagulase test

๔.	Bacitracin	 **ภาพที่ ๒๗** แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin **ภาพที่ ๒๘** แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin
๕.	Novobiocin	 **ภาพที่ ๒๙** แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin

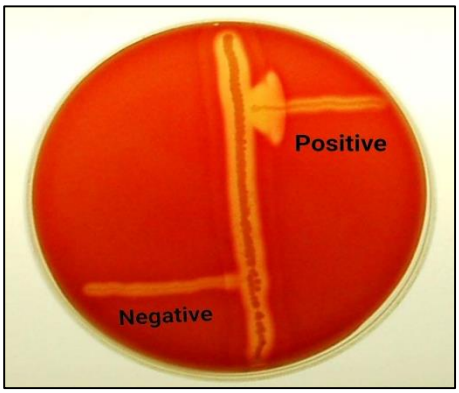
		 ภาพที่ ๓๐ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Novobiocin
๖.	Colony on blood agar	 **ภาพที่ ๓๑** แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ β - hemolysis  **ภาพที่ ๓๒** แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ α - hemolysis

<table>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>
ภาพที่ ๓๓ แสดงผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบ γ - hemolysis</td>
</tr>
<tr>
<td>๗.</td>
<td>Bile esculin

๖.๕% Nacl</td>
<td> 
ภาพที่ ๓๔ แสดงผลการทดสอบ Bile esculin

ภาพที่ ๓๕ แสดงผลการทดสอบ ๖.๕% $NaCl_{๒}$</td>
</tr>
</table>

๘.	Optochin	 **ภาพที่ ๓๖** แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ Optochin **ภาพที่ ๓๗** แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Optochin
๙.	Bacitracin	 **ภาพที่ ๓๘** แสดงผลการ Susceptible ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin

		 ภาพที่ ๓๙ แสดงผลการ Resistant ของเชื้อจุลินทรีย์ ต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin
๑๐.	Camp test	 **ภาพที่ ๔๐** แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาการทดสอบ Camp test ของเชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างการวิเคราะห์แบคทีเรียแกรมบวก โดยการเปรียบเทียบจากแผนภาพขบวนการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) สามารถวิเคราะห์และลงผลการทดสอบ ลงในแบบประเมินผลการทดลอง ดังนี้

รายงานผลปฏิบัติการเรื่อ

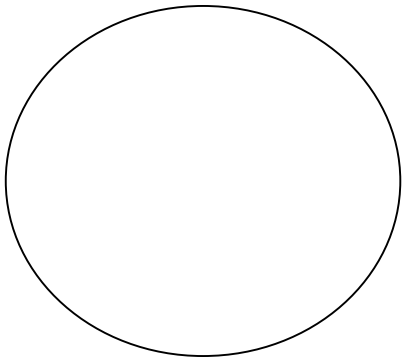
Pathogenic bacteriology gram positive

(การพิสูจน์เชื้อกลุ่มแกรมบวก, aerobic bacteria)

Unknown.....

๑. ศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมจาก Blood agar

ให้วาดภาพที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (๑๐๐x) และบันทึกผลจากการย้อมแกรม



รูปร่างเซลล์.....

ลักษณะการจัดเรียงตัว.....

การติดสี .....

ผลการทสอบชีวเคมี

Catalase test.....Coagulase test.....

CAMP test.....

Bacitracin .....Optocin .....Novobiocin .....

Bile esculin.....

๖.๕% NaCl or SF broth.....

เชื้อ Unknown.....คือ.....

ยกตัวอย่าง เช่น

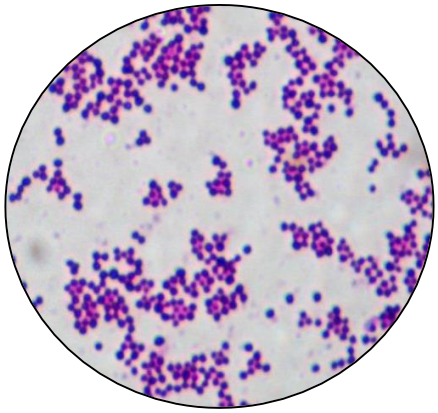
นักศึกษา กอไก่ ได้รับตัวอย่างเชื้อ ๒ ตัวอย่าง ชื่อว่า Unknown ๑ และ Unknown ๒ (ให้ผู้ทำปฏิบัติการอ้างอิง แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) ให้ลงผลปฏิบัติการ ดังนี้

Unknown.....๑.....

๑. ศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมจาก Blood agar

ให้วาดภาพที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (๑๐๐x) และบันทึกผลจากการย้อมแกรม

(เมื่อย้อมแกรม ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย ๑๐๐x เห็นดังนี้)



รูปร่างเซลล์...cocci...

ลักษณะการจัดเรียงตัว ... cluster...

การติดสี ....ติดสีม่วง (Gram Positive cocci in cluster).....

ผลการทดสอบชีวเคมี

Catalase test...Positive...(หลังจากทดสอบ Catalase test แล้ว เกิดฟองฟู่ให้ลงผล Catalase Positive นั่นหมายถึงว่าเชื้อชนิดดังกล่าว ต้องทำการทดสอบ coagulase test ในขั้นตอนต่อไป)

Coagulase test...Positive ... (หลังการทดสอบ coagulase test พบว่า พลาสมาจับตัวกันเป็นก้อน ให้ลงผล Coagulase test Positive) เมื่อสังเกตุ แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) จะพบว่า สามารถวิเคราะห์เชื้อนี้ได้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิด ***Staphylococcus aureus*** สามารถสรุปผลได้เลยในช่องสรุป

Hemolysis.....-.....

CAMP test.....-.....

Bacitracin.....-.....

Optocin.....-.....

Novobiocin.....-.....

Bile esculin.....-.....

๖.๕% NaCl or SF broth.....-.....

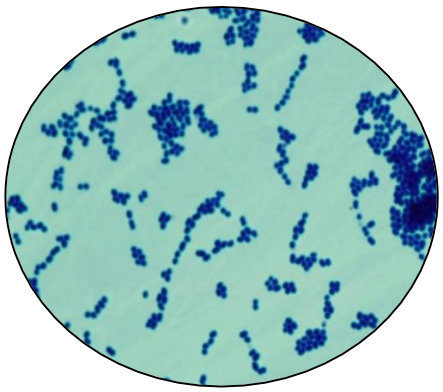
เชื้อ Unknown.....๑.....คือ..... *Staphylococcus aureus* .....

Unknown.....๒.....

๑. ศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมจาก Blood agar

ให้วาดภาพที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (๑๐๐x) และบันทึกผลจากการย้อมแกรม

(เมื่อย้อมแกรม ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย ๑๐๐x เห็นดังนี้)



รูปร่างเซลล์ cocci ลักษณะการจัดเรียงตัว chain การติดสี ติดสีม่วง (Gram Positive cocci in chain).....

ผลการทดสอบชีวเคมี

Catalase test Negative (หลังจากทดสอบ Catalase test แล้ว ไม่เกิดฟองฟู่ให้ลงผล Catalase Negative นั่นหมายถึง เชื้อชนิดดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม ***Streptococci*** ไม่ต้องทำการทดสอบ coagulase test แต่จะต้องสังเกตุการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในขั้นตอนต่อไป)

Coagulase test.....-.....

Hemolysis.....Beta hemolysis (เมื่อสังเกตุการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงพบว่าสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์) ในขั้นตอนต่อไปให้ทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Bacitracin

Bacitracin.....Resistant (เมื่อสังเกตุการทดลองพบว่าเชื้อดื้อต่อยา Bacitracin ให้ลงผลเป็น Resistant) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปให้ทดสอบ CAMP Test

CAMP test.....Negative...(เมื่อสังเกตุการทดลองพบว่าไม่เกิด CAMP factor ดังนั้นเชื้อนี้ต้องไม่ใช่ ***s.agalactiae*** ...ให้ลงผลเป็น CAMP test Negative ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปต้องทำการทดลองใน Bile esculin กับ **๖.๕% NaCl or SF broth**).....

Optocin.....-.....

Novobiocin.....-.....

Bile esculin.....Positive .....(เมื่อสังเกตุการทดลองพบว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ แสดงว่าเชื้อเป็น Positive)

๖.๕% NaCl or SF broth...Positive... (เมื่อสังเกตุการทดลองพบว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อเป็น Positive)

เชื้อ Unknown.....๒.....คือ..... ***Enterococci sp.*** .....

๔.๓ วิธีการให้บริการกับผู้รับบริการที่มีการพึงพอใจ

การบริการ คือ การให้ความช่วยเหลือหรือการดำเนินการเพื่อประโยชน์ของผู้อื่น การบริการที่ดีผู้รับบริการจะได้รับความประทับใจและเกิดความชื่นชมองค์กร อันเป็นการสร้างภาพลักษณ์ที่ดีแก่องค์กร เบื้องหลังความสำเร็จของทุกงาน มักจะมีงานบริการเป็นเครื่องมือในการสนับสนุน ไม่ว่าจะเป็นงานประชาสัมพันธ์ งานบริการวิชาการต่างๆ ตลอดทั้งความร่วมมือร่วมแรงร่วมใจจากเจ้าหน้าที่ทุกระดับ ซึ่งจะต้องช่วยกันขับเคลื่อนพัฒนางานบริการให้มีคุณภาพและมีประสิทธิภาพ จนเกิดเป็นการบริการ โดยงานห้องปฏิบัติการมีหลักในการบริการดังนี้

๑. มีความเต็มใจในการให้บริการ

๒. มีอารมณ์ที่มั่นคง มีความกระตือรือร้นที่จะให้บริการ

๓. ตอบคำถาม ให้คำแนะนำกับผู้รับบริการได้อย่างถูกต้อง

๔. เตรียมวัสดุอุปกรณ์ ให้พร้อมเสมอสำหรับการให้บริการ

จะเห็นว่าเป้าหมายของการให้บริการนั้นคือ การสร้างความพึงพอใจแก่ผู้ใช้บริการ ดังนั้นการที่จะวัดการให้บริการว่าจะบรรลุเป้าหมายหรือไม่นั้นมีอีกวิธีหนึ่ง คือ การวัดความพึงพอใจของผู้รับบริการ เพราะการวัดความพึงพอใจนี้ เป็นการตอบคำถามว่าหน่วยงานมีหน้าที่ให้บริการ มีความสามารถสนองตอบต่อความต้องการได้หรือไม่ เพียงใด อย่างไร โดยใช้แบบประเมินความพึงพอใจ ซึ่งในปี ๒๕๕๘ งานห้องปฏิบัติการได้รับความพึงพอใจอยู่ที่ร้อยละ ๘๙.๙๘ ปี ๒๕๕๙ อยู่ที่ร้อยละ ๘๓.๕๐ และปี ๒๕๖๐ อยู่ที่ร้อยละ ๙๕.๗๕

๔.๔ วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน

เป้าหมายของงานการเรียนการสอนคือ การผลิตบัณฑิตวิทยาศาสตร์สุขภาพให้เป็นผู้ที่เปี่ยมไปด้วยความรู้ด้านวิชาการ ฝึกฝนทักษะการปฏิบัติงานจากการใช้ปัญหาเป็นพื้นฐาน เพื่อการพัฒนาตนเองในการตัดสินใจ สามารถแก้ไขปัญหาในการปฏิบัติงานจริง โดยมุ่งเน้นการพัฒนาการเรียนการสอนที่มีประสิทธิภาพเป็นหลักโดยจะใช้วิธีการติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงานดังนี้

เป้าประสงค์	กลยุทธ์	ดัชนีย์ความสำเร็จ	เป้าหมาย	โครงการ
จัดหาทรัพยากรและสิ่งสนับสนุนการเรียนรู้	ห้องปฏิบัติการ	๑. ระดับความพึงพอใจการใช้ห้องปฏิบัติการ จากผู้ใช้บริการ	ระดับดี	แบบประเมินความพึงพอใจงานห้องปฏิบัติการ
		๒. มีวัสดุ อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการที่เพียงพอ กับความต้องการ และการเรียน การสอน	ตลอดปีการศึกษา	โครงการให้บริการสนับสนุนการเรียนการสอนห้องปฏิบัติการ
		๓. มีสื่อการเรียนการสอน เช่นครุภัณฑ์หรือเครื่องมือในห้องปฏิบัติการเป็นไปตามเกณฑ์ และสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของรายวิชา	๗๐%	โครงการจัดหาครุภัณฑ์ประจำปีงบประมาณ

๔.๕ แนวปฏิบัติที่ดีในการปฏิบัติงาน

ผู้ทำปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาจะต้องเข้าใจถึงหลักการ หลักปฏิบัติทางจุลชีววิทยา ตลอดจนกฎระเบียบขั้นพื้นฐาน และต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด โดยหลักใหญ่ๆที่ต้องตระหนักอยู่ตลอดเวลา ได้แก่

๑) ป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากภายนอกลงใน หลอด หรือจานเพาะเชื้อ ฯลฯ

๒) ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ปนเปื้อน หรือแพร่กระจายไปสู่สภาวะแวดล้อม ไม่ว่าจุลินทรีย์นั้น จะเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่

๓) การปฏิบัติงานทางจุลชีววิทยา ผู้ปฏิบัติการต้องเรียนรู้และฝึกเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) จนสามารถปฏิบัติได้คล่อง

๔) การปฏิบัติงานกับเชื้อจุลินทรีย์ ต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet) เท่านั้น

๕) ห้ามรับประทานอาหาร ดื่มน้ำ หรือสูบบุหรี่ในระหว่างทำงานที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ หรืออยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

๖) ต้องสวมเสื้อปฏิบัติการทุกครั้งเมื่อปฏิบัติงานการเชื้อจุลินทรีย์

๗) กรณีที่มีเชื้อจุลินทรีย์หก หรือตกหล่นบริเวณใด ต้องรีบทำความสะอาดโดยเช็ดน้ำยาฆ่าเชื้อทันทีเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์

๘) เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองแล้ว ต้องทำความสะอาดภาชนะที่มีเชื้อค้างอยู่ ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

๙) เก็บขยะหรือสิ่งที่ต้องการทิ้งและที่ใช้แล้วกับจุลินทรีย์ในภาชนะ หรือบริเวณที่กำหนด เพื่อการจัดการ ตามขั้นตอนที่ถูกต้องขั้นตอนที่ถูกต้องต่อไป เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อสารอาหารที่ใช้แล้วหรือมีเชื้อเจริญอยู่ หรือการแช่เครื่องแก้วในน้ำยาเคมีก่อนล้างทำความสะอาดปกติจานเพาะเชื้อ

๑๐) ต้องมีฝาครอบ หลอดหรือขวดเชื้อ ต้องมีจุกอุดตลอดเวลา ถึงแม้ว่าการทดลองจะสิ้นสุดแล้ว

๑๑) ต้องไม่วางหลอดเชื้อ หรือขวดเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว ในลักษณะเอียง ซึ่งอาจทำให้จุกสำลีดูดซับอาหารและเชื้อ จนเป็นเหตุให้จุลินทรีย์ ทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกหลอด สามารถเจริญบนจุกสำลีนั้นได้

๑๒) ขยะหรือสิ่งที่ต้องการทิ้งและที่ใช้แล้วกับจุลินทรีย์ในภาชนะ/บริเวณที่กำหนด เพื่อการจัดการตามขั้นตอนที่ถูกต้องขั้นตอนที่ถูกต้องต่อไป เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อสารอาหารที่ใช้แล้วหรือมีเชื้อเจริญอยู่ หรือการแช่เครื่องแก้วในน้ำยาเคมีก่อนล้างทำความสะอาดปกติ

๑๓) ต้องล้างมือก่อนและหลังทำงานกับเชื้อจุลินทรีย์ทุกครั้ง

๔.๖ จรรยาบรรณ คุณธรรม จริยธรรมในการปฏิบัติงาน

จรรยาบรรณต่อตนเอง

๑) พึงประพฤติตนตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง

๒) พึงเป็นผู้มีศีลธรรมอันดี และประพฤติตนให้เหมาะสมกับการปฏิบัติหน้าที่ราชการ

๓) พึงประพฤติตนถูกต้องตามทำนองครองธรรม วางตนเป็นแบบอย่างที่ดี

๔) พึงไม่กล่าวอ้างหรือใช้สัญลักษณ์หรือชื่อของมหาวิทยาลัย หรือหน่วยงานในสังกัด

๕) มหาวิทยาลัย ในทางที่ทำให้เสื่อมเสียชื่อเสียง

๖) พึงใช้วิชาชีพในการปฏิบัติหน้าที่ด้วยความซื่อสัตย์สุจริต และไม่แสวงหาประโยชน์โดยมิชอบ

๗) พึงมีทัศนคติที่ดีและพัฒนาตนเองให้มีคุณธรรม จริยธรรม รวมทั้งเพิ่มพูนความรู้ ความสามารถ และทักษะในการทำงาน จรรยาบรรณต่อการปฏิบัติงาน และหน่วยงาน

๘) พึงปฏิบัติงานด้วยความซื่อสัตย์ สุจริต และไม่แสวงหาประโยชน์โดยมิชอบ

๙) พึงมีเจตคติที่ดี และพัฒนาตนเองให้มีคุณธรรม จริยธรรม รวมทั้งเพิ่มพูนความรู้

๑๐) ความสามารถ ทักษะในการทำงาน

๑๑) พึงปฏิบัติหน้าที่ราชการด้วยความสุจริต เสมอภาค ปราศจากอคติ

๑๒) พึงปฏิบัติหน้าที่ราชการอย่างเต็มกำลังความสามารถ รอบคอบ รวดเร็ว ขยันหมั่นเพียร ถูกต้องสมเหตุสมผล

๑๓) พึงประพฤติตนเป็นผู้ตรงต่อเวลา และใช้เวลาราชการปฏิบัติหน้าที่ให้เป็นประโยชน์ ต่อทางราชการอย่างเต็มที่

๑๔) พึงดูแลรักษา และใช้ทรัพย์สินของทางราชการอย่างประหยัด และคุ้มค่า จรรยาบรรณต่อนักศึกษา และผู้รับบริการ

๑๕) พึงให้บริการผู้มาติดต่องานอย่างเต็มกำลังความสามารถ ด้วยความเสมอภาค โปร่งใส และเป็นธรรม และใช้ภาษาที่สุภาพเหมาะสม

๑๖) พึงไม่เรียกรับ หรือยอมจะรับทรัพย์สิน หรือประโยชน์อื่นใดจากนักศึกษา หรือผู้รับบริการพึงไม่สอนหรืออบรมนักศึกษา ผู้รับบริการ เพื่อให้กระทำการที่รู้อยู่ว่าผิดกฎหมาย หรือฝ่าฝืนศีลธรรมอันดีของประชาชน

๑๗) พึงไม่เปิดเผยความลับของนักศึกษา หรือผู้รับบริการ ที่ได้มาจากการปฏิบัติหน้าที่ หรือจากความไว้วางใจ

๑๘) พึงไม่ล่วงละเมิดทางเพศ หรือมีความสัมพันธ์ทางเพศกับนักศึกษาซึ่งไม่ใช่คู่สมรสของตน

จรรยาบรรณต่อผู้บังคับบัญชา ผู้ใต้บังคับบัญชาและผู้ร่วมงาน

๑) ผู้บังคับบัญชาพึงดูแลเอาใจใส่ ผู้ใต้บังคับบัญชาทั้งในด้านการปฏิบัติงาน ขวัญกำลังใจ สวัสดิการ และยอมรับฟังความคิดเห็นของผู้ใต้บังคับบัญชา ปกครองผู้ใต้บังคับบัญชาตามหลักธรรมาภิบาล

๒) พึงปฏิบัติต่อผู้บังคับบัญชา ผู้ร่วมงาน ตลอดจนผู้เกี่ยวข้องด้วยความสุภาพ มีน้ำใจไมตรี เอื้ออาทร และมนุษยสัมพันธ์อันดี

๓) พึงมีความรับผิดชอบในการปฏิบัติงาน การให้ความร่วมมือช่วยเหลือกลุ่มงานของตน และส่วนรวม พึงช่วยเหลือเกื้อกูลกันในทางที่ชอบ รวมทั้งส่งเสริม และสนับสนุนให้เกิดความสามัคคี ร่วมแรงร่วมใจในบรรดาผู้ร่วมงาน

๔) พึงละเว้นจากการนำผลงานของผู้อื่นมาเป็นของตน และต้องไม่คัดลอกหรือลอกเลียนผลงานทางวิชาการของผู้อื่นโดยมิชอบ

๕) พึงเคารพเสรีภาพในการแสดงความคิดเห็น ยกย่อง ให้เกียรติในศักดิ์ศรีของเพื่อนร่วมงาน

บทที่ ๕

ปัญหา อุปสรรค แนวทางแก้ไข และพัฒนางาน

๕.๑ ปัญหา อุปสรรคในการปฏิบัติงาน

ในการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของเชื้อแกรมบวกในกลุ่ม streptococci นั้น พบว่าเชื้อดังกล่าวย่อยสลายได้ไม่ดีในเลือดมนุษย์ แต่ย่อยสลายได้ดีในเลือดแกะ ซึ่งการจัดซื้อจัดหาเลือดสัตว์ทดลองนั้นหาซื้อได้ยากและไม่สะดวก เนื่องจากการจัดซื้อต้องซื้อและใช้ในระยะเวลาที่กำหนด แต่ปัญหาคือกว่าจะผ่านระบบการจัดซื้อจัดจ้างของมหาวิทยาลัย และกว่าผู้จำหน่ายจะจัดหาเลือดสัตว์ทดลองมาให้นั้น ใช้ระยะเวลายาวนาน มีระยะเวลาที่ไม่แน่นอน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เลือดมนุษย์ทดแทน ซึ่งสามารถขอความอนุเคราะห์ได้ที่หน่วยบริการโลหิตแห่งชาติที่ ๗

๕.๒ แนวทางแก้ไขและพัฒนางาน

การที่จะหาเลือดมาทดแทนเลือดมนุษย์นั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นหากจำเป็นต้องดูการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสามารถเพิ่มระยะเวลาการบ่มเชื้อแบคทีเรียจาก ๒๔ ชั่วโมงเป็น ๔๘ ชั่วโมง จะทำให้การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงชัดเจนยิ่งขึ้น

๕.๓ ข้อเสนอแนะ

๕.๓.๑ ในการทดลองภายในห้องปฏิบัติการต้องระลึกอยู่เสมอว่า ห้องปฏิบัติการทดลองเป็นสถานที่ทำงาน ต้องทำการทดลองด้วยความตั้งใจอย่างจริงจัง

๕.๓.๒ ต้องรักษาระเบียบบนโต๊ะปฏิบัติการ เพราะการทดลองจะผิดพลาดได้ง่ายถ้าบนโต๊ะ ปฏิบัติการไม่มีระเบียบ เช่น อาจหยิบหลอดทดลองผิด นอกจากนี้การรักษาระเบียบบนโต๊ะปฏิบัติการ ยังสามารถช่วยลดอุบัติเหตุ และยังเป็นการช่วยประหยัดเวลาในการค้นหาสิ่งของที่ต้องการอีกด้วย

๕.๓.๓ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอทุกครั้งก่อนที่จะทิ้งหรือล้างทำความสะอาด แล้วต้องล้างให้สะอาดเก็บเข้าตู้เมื่อไม่ต้องการใช้ทดลองอีก

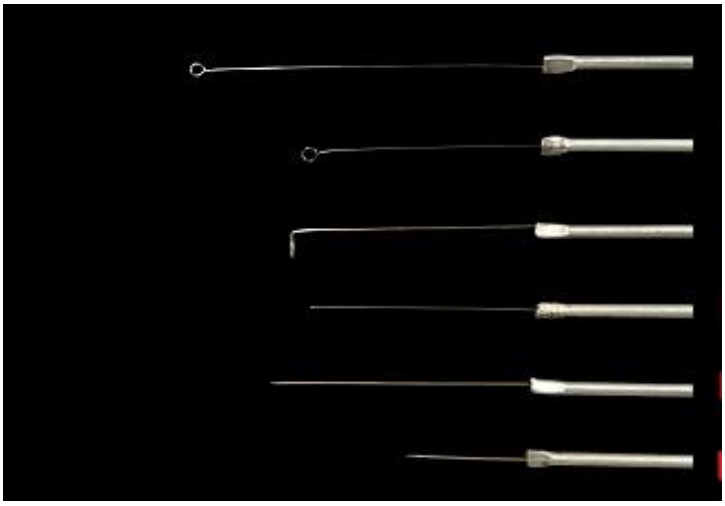
๕.๓.๔ ในการทำการทดลองที่เกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียต้องป้องกันตนเองโดย การสวมเสื้อกาวน์ ใส่ถุงมือและเก็บผมให้เรียบร้อยทุกครั้งก่อนการปฏิบัติการ และพยายามทำในตู้ปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถป้องกันอันตรายได้อีกระดับหนึ่ง

ภาคผนวก

ภาคผนวก

๑. เครื่องมือหลักในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

๑.๑ เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating needle and loop) ทำด้วยลวดที่เป็นตัวนำความร้อนได้ดี เช่น nichrome หรือ platinum มีด้านถือเป็นฉนวนความร้อน loop มีลักษณะเป็นเส้นลวดมีปลายขดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๔ มิลลิเมตร ส่วน needle มีปลายเหยียดตรง เวลาใช้เข็มเขี่ยเชื้อจะต้องทำให้ปราศจากเชื้อโดยการเผาจนกระทั่งลวดร้อนแดง และปล่อยให้เย็นก่อนนำไปใช้ (ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ ๘ วินาที)



ภาพที่ ๒๑ แสดงลักษณะของเข็มเขี่ยเชื้อ

๑.๒ จานเพาะเชื้อ (Petri dish) มีลักษณะคล้ายจานทรงกระบอกแบบตื้น ๒ ใบประกบกัน ใบที่เป็นฝาจะใหญ่กว่าเล็กน้อยเพื่อให้ครอบอีกใบหนึ่งได้ วัสดุทำด้วยแก้ว ปัจจุบันมีการผลิตจานเพาะเชื้อด้วย polystyrene ในลักษณะที่ปราศจากเชื้อบรรจุอยู่ในถุง polythene ใช้แล้วจะทิ้งเลย จานเพาะเชื้อใช้สำหรับใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตรอาหารที่จะบรรจุลงในแต่ละจานราว ๑๕ มิลลิลิตร ถ้าน้อยไปจะทำให้อาหารแห้งและสูญเสียสมบัติเมื่อใส่ในตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator)

๑.๓ หลอดเลี้ยงเชื้อ (culture tube) เป็นหลอดทดลอง (test tube) ขนาดต่างๆ ทั้งแบบธรรมดาซึ่งใช้สำลีอุดเป็นจุกและแบบปิดจุกเกลียว อาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุในหลอดทดลองมีทั้งชนิดที่เป็นของแข็งประเภทวุ้น (agar) และของเหลว (broth) เมื่อบรรจุอาหารในหลอดทดลองเรียบร้อยแล้วต้องปิดปากหลอดไว้ เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียตกลงไปและอาหารบางชนิด ต้องใช้หลอดชนิดปิดด้วยจุกเกลียวเพื่อสภาวะบางอย่าง

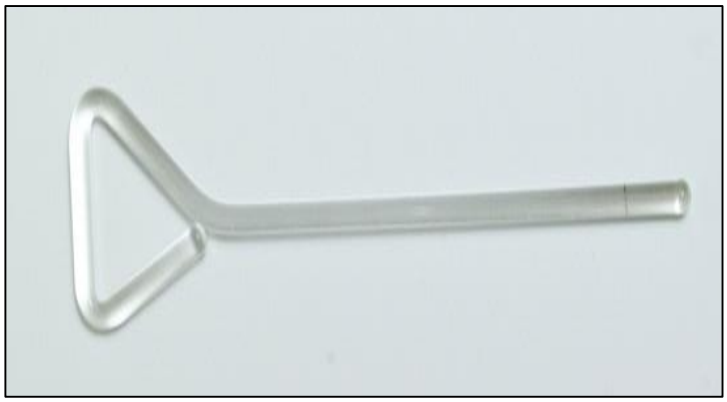
๑.๔ เครื่องดูดจ่ายสารละลาย คือ เครื่องมือที่ใช้ดูดและจ่ายสารละลายปริมาตรตั้งแต่ ๑ - ๑๐๐ มิลลิลิตร

ภาพที่ ๒๒ แสดงลักษณะของเครื่องดูดจ่ายสารละลาย

๑.๕ ปิเปต (Pipette) ใช้ในการถ่ายของเหลวจำนวนที่แน่นอนจากภาชนะหนึ่งไปยังอีกภาชนะหนึ่ง ในทางจุลชีววิทยาปิเปตที่ใช้มักอุดปลายด้านที่ใช้ดูดด้วยจุกสำลี เพื่อกรองเชื้อไม่ให้ผ่านลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ ๒๓ แสดงลักษณะของปิเปต (Pipette) ขนาดต่างๆ

๑.๖ แท่งแก้วงอสามเหลี่ยม (Glass spreader) ใช้ในการเกลี่ยนตัวอย่างเหลวหรือสารละลายแบคทีเรีย ให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ



ภาพที่ ๒๔ แสดงลักษณะของแท่งแก้วงอสามเหลี่ยม (Glass spreader)

๑.๗ ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp) เป็นตะเกียงที่ใช้แอลกอฮอล์เป็นเชื้อเพลิง ใช้ประโยชน์สำหรับใช้เผาฆ่าเชื้อที่ติดอยู่กับเครื่องมือบางอย่าง เช่น loop, needle, pipette และ forceps เป็นต้น

๑.๘ ตะเกียงก๊าซ (Bunsen burner) เป็นตะเกียงที่ใช้ก๊าซหุงต้มเป็นเชื้อเพลิง ใช้ประโยชน์อย่างเดียวกับตะเกียงแอลกอฮอล์ เปลวไฟจากตะเกียงก๊าซจะร้อนมากกว่าเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ และใช้เวลาในการเผาเข็มเขี่ยเชื้อน้อยกว่าเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

ภาพที่ ๒๕ แสดงลักษณะของตะเกียงก๊าซ

๑.๙ เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) สามารถเลือกผสมสารละลายได้ทั้งแบบ Touch Mixing หรือ Continuous Mixing ใช้ในการผสมสารละลาย

ภาพที่ ๒๖ เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

๑.๑๐ ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) เป็นตู้อบที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตามต้องการ ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป เช่น แบคทีเรียซึ่งส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส

ภาพที่ ๒๗ แสดงลักษณะของตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)

๑.๑๑ ตู้เย็น (Refrigerator) ใช้สำหรับเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ต้องการใช้ ตอลดจนสารเคมีและน้ำยาที่จำเป็นต้องเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำๆ เช่น serum, plasma, ยาปฏิชีวนะและเลือด เป็นต้น ในกรณีที่ต้องการเก็บแบคทีเรียไว้เป็นเวลานานๆ โดยไม่ต้องการให้เพิ่มจำนวนมาก อาจเก็บไว้ในตู้เย็นได้ ยกเว้นเชื้อบางชนิดที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิต่ำๆ

๑.๑๒ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) เป็นอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิได้ตามต้องการ ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีอุณหภูมิพอเหมาะสำหรับใช้ในการทดลอง บางกรณีอาจใช้แทนตู้อบเพาะเชื้อ

๑.๑๓ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ โดยอาศัยความร้อนของไอน้ำเดือดภายใต้ความดัน ลักษณะของเครื่องมือเป็นรูปทรงกระบอกมีฝาปิดที่แข็งแรง ภายในมีช่องว่าง (chamber) สำหรับบรรจุสิ่งของที่ต้องการฆ่าเชื้อ รูปทรงกระบอกนี้อาจวางอยู่ในแนวตั้งหรือแนวนอนก็ได้ แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ด้านล่างมีช่องสำหรับบบรจุน้ำ ซึ่งเมื่อต้มให้เดือดจะกลายเป็นไออัดแน่นอยู่ภายในจะมีอุณหภูมิสูงถึง ๑๒๑ องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารารงนิ้ว ตามปกติถ้าวัตถุอยู่ภายใต้สภาพนี้นาน ๑๐-๑๕ นาทีจะปราศจากสิ่งมีชีวิตทุกอย่าง (sterile) เครื่องมือนี้ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) และอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ที่ต้องการทำให้ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย

ภาพที่ ๒๘ แสดงลักษณะของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

๑.๑๔ ตู้อบความร้อน (Hot air oven) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิธีการทำไร้เชื้อด้วยความร้อนแห้ง ตู้อบถูกทำให้ร้อนด้วยไฟฟ้า และมีตัวควบคุมอุณหภูมิสำหรับรักษาระดับของอุณหภูมิให้คงที่ มีพัดลมช่วยเป่าหรือช่วยในการหมุนเวียนของอากาศ ทำให้ได้รับความร้อนทั่วถึง มักใช้อุณหภูมิ ๑๗๐-๑๘๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง (ไม่นับ heating time) การใช้ Hot air oven เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการฆ่าเชื้อพวกเครื่องแก้วที่แห้ง เช่น หลอดแก้ว, จานเลี้ยงเชื้อ และเครื่องมือต่างๆ เช่น มีดผ่าตัด, กรรไกร, เข็มฉีดยา และ Flask (ก่อนฆ่าเชื้อควรปิดปากขวดด้วยฟอล์ยอลูมิเนียม) ส่วนเครื่องแก้วอย่างอื่น เช่น ปิเปตอาจใส่กระบอกโลหะ วิธีนี้ยังใช้ฆ่าเชื้อสารที่แห้งที่อยู่ในภาชนะที่ปิดมิดชิด พวก powder, ไขมัน, น้ำมัน และไขซึ่งไม่ยอมให้ความชื้นผ่านไปได้ วัตถุเหล่านี้ความร้อนผ่านทะลุได้ช้ามาก จึงต้อง sterilize ทีละน้อย ๆ เป็นชั้นบาง ๆ เช่น ห่อไม่เกิน ๑๐ กรัม หรือชั้นลึกไม่เกิน ๕ มิลลิเมตร ในจานแก้ว สิ่งสำคัญที่ต้องควรจำก็คือ ของทุกอย่างที่นำเข้า hot air oven นี้ต้องแห้ง มิฉะนั้นจะแตก

ภาพที่ ๒๙ แสดงลักษณะของตู้อบความร้อน (Hot air oven)

๑.๑๕ ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) เป็นเครื่องมือพื้นฐานจำเป็นสำหรับห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา ตู้ปลอดเชื้อมักใช้กับงานที่ต้องการความปลอดภัยทางชีววิทยาสูง เช่น การเขี่ยเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสามารถแบ่งประเภทของตู้ปลอดเชื้อได้ตามระดับความปลอดภัยของตู้ได้เป็น ๓ Class สิ่งจำเป็นสำหรับตู้ปลอดเชื้อคือแผ่นกรอง HEPA ซึ่งจะช่วยกรองอากาศที่ผ่าน เข้า-ออก ภายในตู้ ซึ่งมีการไหลเวียนแบบ Laminar Flow ปัจจุบันตู้ปลอดเชื้อได้รับการออกแบบตามหลักของ Ergonomic ทำให้สามารถทำงานได้สะดวกสบาย มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และปลอดภัยจากการปนเปื้อน

ภาพที่ ๓๐ แสดงลักษณะของตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)

๒.วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

๒.๑ อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar

วิธีการเตรียม

๑) ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรอาหารดังต่อไปนี้

Beef heart, infusion form	๕๐๐	กรัม
Tryptose	๑๐	กรัม
Sodium chloride	๕	กรัม

Agar	๑๕	กรัม
น้ำกลั่น	๑,๐๐๐	มิลลิลิตร

๒) ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่นคนด้วยแท่งแก้ว ให้ส่วนประกอบของอาหารละลายโดยใช้ ความร้อนช่วย แล้วปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น

๓) วัดความเป็นกรดด่างด้วยกระดาษวัด pH ถ้าอาหารเป็นกรด หรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วยสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์เข้มข้น ๐.๑ นอร์มอล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ๐.๑ นอร์มอล จนได้ pH ประมาณ ๗.๓ ±๒

๔) บรรจุอาหารทีเตรียมเสร็จแล้ว โดยเติมอาหารที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้วขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร จำนวน ๒ ขวด ขวดละ ๕๐๐ มิลลิลิตร

๕) ปิดขวดด้วยฝาเกลียวให้สนิทแล้วคลายเกลียวออกครึ่งรอบ (ภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดเกลียวให้แน่น)

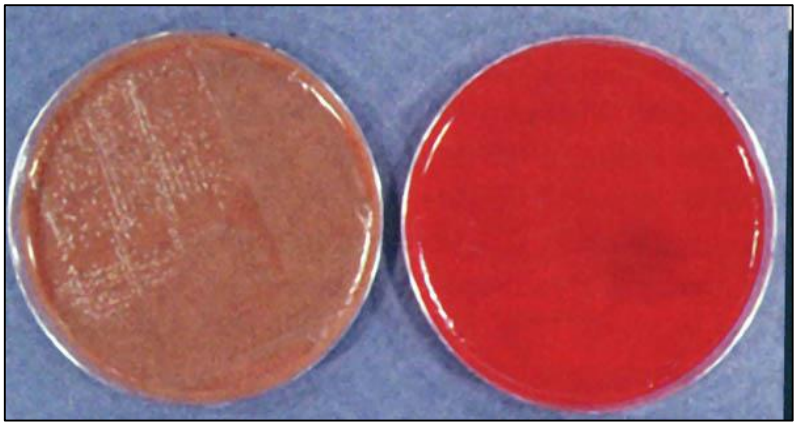
๖) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave sterile) ที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ๑๕ นาที (๑๕ ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว)

๗) หลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งอาหารไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิประมาณ ๕๐ องศาเซลเซียส แล้วเติมเลือดปลอดเชื้อจำนวน ๒๕ มิลลิลิตร/ขวด (เติมเลือด ๕% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

๘) ค่อยๆหมุนขวดไปเพื่อให้เลือดกระจายจนทั่วอาหาร ห้ามเขย่าขวด หรือหมุนแบบแรง เพราะจะทำให้มีฟองอากาศ หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อบนเพลทจะไม่เรียบ

๙) เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนเพลทปลอดเชื้อประมาณเพลทละ ๒๕ มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัวก่อนเริ่มใช้งาน

๑๐) ทำความสะอาดภาชนะ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย



ภาพที่ ๓๑ แสดงตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar

๒.๒ Trypticase soy broth

วิธีการเตรียม

๑) ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ตามสูตรอาหารดังต่อไปนี้

Pancreatic digest of casein	๑๗	กรัม
Enzymatic digest of soya bean	๓	กรัม
Sodium chloride	๕	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	๒.๕	กรัม
น้ำกลั่น	๑,๐๐๐	มิลลิลิตร

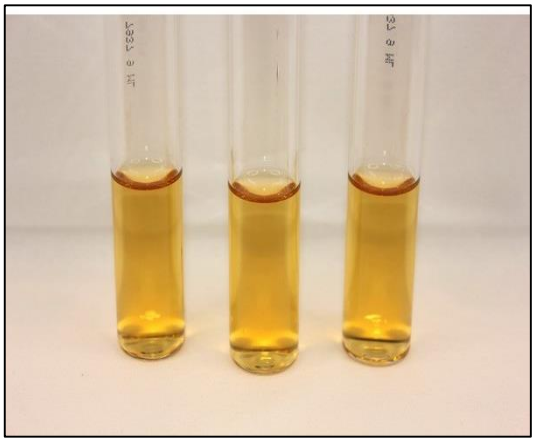
๒) ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่นคนด้วยแท่งแก้ว ให้ส่วนประกอบของอาหารละลาย โดยใช้ความร้อนช่วย แล้วปรับปริมาตรให้ครบตามสูตรด้วยน้ำกลั่น

๓) วัดความเป็นกรดด่างด้วยกระดาษวัด pH ถ้าอาหารเป็นกรด หรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ๐.๑ นอร์มอล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ๐.๑ นอร์มอล จนได้ pH ประมาณ ๗

๔) บรรจุอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วใส่หลอดแก้วฝาครอบ ขนาด ๑๒ **x** ๑๐๐ มิลลิเมตร ปริมาณหลอดละ ๒ มิลลิลิตร

๕) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave sterile) ที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ๑๕ นาที (๑๕ ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว)

๖) ทำความสะอาดภาชนะ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารให้เรียบร้อย



ภาพที่ ๓๒ แสดงตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth

๓. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

๓.๑ Bile esculin agar (เป็นอาหารสำเร็จรูป)

วิธีการเตรียม

๑. เตรียมส่วนผสมตามคำแนะนำข้างขวด ต้มให้อาหารละลาย แบ่งใส่หลอดแก้ว ๑๓x๑๐๐ มิลลิเมตร หลอดละ ๓ มิลลิลิตร

๒. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที (๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) แล้วนำมาวางเอียง ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

๓. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร bile esculin slant agar

๓.๒ ๖.๕% NaCl หรือ Selenite F broth

วิธีการเตรียมอาหารสำหรับการทดสอบนี้มีอยู่ ๒ แบบ

แบบที่ ๑ ๖.๕% NaCl agar slant

Brain heart infusion agar	๒๖	กรัม

Glucose	๕	กรัม
Sodium chloride	๓๐	กรัม
Bromcresol purple (๑% ethanol)	๑	มิลลิลิตร
Proteose peptone	๕	กรัม
น้ำกลั่น	๕๐๐	กรัม

*** pH = ๗.๐

๑) นำสารละลายทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ทำให้ละลายอย่างสมบูรณ์ โดยนำไปตั้งไฟ พร้อมทั้งเขย่า

๒) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที (๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) แล้วนำมาวางเอียง ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

แบบที่ ๒ ๖.๕% NaCl (broth)

Phenol red broth base (Gibco)	๑.๕	กรัม
Peptone	๑๐	กรัม
Sodium chloride	๕	กรัม
Phenol red	๐.๐๑๘	กรัม
Dextroxe	๐.๕	กรัม
Sodium chloride	๖.๕	กรัม
Beef extract	๐.๑	กรัม
Distilled water	๑๐๐	กรัม

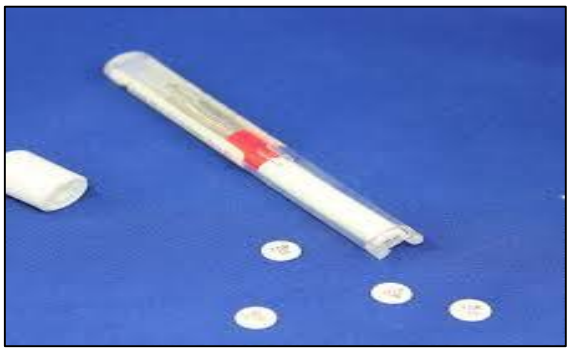
*** pH ๗.๔

๑) ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับ pH ให้เรียบร้อย

๒) แบ่งใส่หลอดแก้ว ๑๓x๑๐๐ มิลลิเมตร หลอดละ ๒ มิลลิลิตร

๓) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๕ นาที (๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

๓.๓ Susceptibility disc Optochin Bacitracin Novobiocin



ภาพที่ ๓๓ แสดงตัวอย่าง Susceptibility disc

๓.๔ สารละลาย ๓% Hydrogen peroxide

ภาพที่ ๓๔ แสดงตัวอย่างสารละลาย ๓% Hydrogen peroxide

ภาพที่ ๓๕ แสดงตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในขวดอาหารสำเร็จรูป

แบบสอบถามความพึงพอใจ
การบริหารจัดการงานห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข

.....

โปรดทำเครื่องหมาย / ลงในช่องระดับตามความเหมาะสมเกี่ยวกับการจัดสภาพแวดล้อมและการให้บริการ ด้านอาคารสถานที่ของงานอาคารสถานที่และสิ่งแวดล้อม

สถานะ ☐ บุคลากร ☐ สายสนับสนุน ☐ สายวิชาการ
☐ นักศึกษา ☐ สาขาแพทยศาสตร์ ☐ สาขาสาธารณสุขศาสตร์

องค์ประกอบ	ระดับความเหมาะสม				
	มากที่สุด (๕)	มาก (๔)	ปานกลาง (๓)	น้อย (๒)	น้อยที่สุด (๑)
๑. ห้องปฏิบัติการมีความสะอาดและเป็นระเบียบ					
๒. มีเครื่องมือ และอุปกรณ์เพียงพอกับนักศึกษา					
๓. เครื่องมือ และอุปกรณ์มีประสิทธิภาพพร้อมใช้ในการปฏิบัติงาน					
๔. จำนวนห้องปฏิบัติการเพียงพอต่อการจัดการเรียนการสอนปฏิบัติการ					
๕. แสงสว่างเพียงพอ					

ข้อเสนอแนะความต้องการปรับปรุง พัฒนาด้านต่าง ๆ ในอนาคตที่ท่านต้องการให้เกิดขึ้น

.....
.....
.....

ภาพที่ ๓๕ แสดงตัวอย่างแบบสอบถามความพึงพอใจการบริหารจัดการงานห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์