การศึกษาการปนเปื้อน Bacillus cereus ในพื้นที่ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดย
นางสาวทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ข ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาการปนเปื้อน Bacillus cereus ในพื้นที่ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดย
นางสาวทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ข ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

THE STUDY OF *BACILLUS CEREUS*CONTAMINATION IN VIRUS LABORATORY FACULTY OF VETERINARY

By

MISS Thipphawan THONGDONMUEAN

An Independent Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

Department of ENVIRONMENTAL SCIENCE

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การศึกษาการปนเปื้อน Bacillus cereus ในพื้นที่ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โดย	ทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ข ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ ศรีแดง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

---------- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

---------- ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ดาวรุ่ง สังข์ทอง)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ศรีแดง)

---------- ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มานะกร สุขมาก)

59311305 : วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม แผน ข ระดับปริญญามหาบัณฑิต

นางสาว ทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน: การศึกษาการปนเปื้อน Bacillus cereus ในพื้นที่ปฏิบัติงาน ห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ ศรีแดง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่ถูกส่งตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ โดยเก็บตัวอย่างบนพื้นที่ผิวบริเวณปฏิบัติงาน 7 จุด และบนมือของผู้ปฏิบัติงาน 5 คน รวมเป็นจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 12 จุด มีความถี่ในการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 ครั้งต่อเดือน รวมทั้งสิ้น 12 ครั้งต่อจุดเก็บตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 144 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างขณะก่อนปฏิบัติงานและหลังปฏิบัติงานเสร็จสิ้นในแต่ละวัน ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเพื่อตรวจการปนเปื้อนโดยการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารวุ้นชนิดเติมเลือด (Blood agar) และแมคคองกีเอการ์ (MacConkey agar) ย้อมสีจำเพาะชนิดแกรม (Gram staining) วัดด้วยเครื่องแมคฟาร์แลนด์และวิธีทางชีวเคมี ผลการศึกษาพบว่าในพื้นที่ทั้งหมดก่อนการปฏิบัติงาน และหลังปฏิบัติงาน ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ในทุกจุดเก็บตัวอย่าง แต่พบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus spp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการเป็นพิษ ผลวิเคราะห์พบการปนเปื้อนก่อนปฏิบัติงานคิดเป็นร้อยละ 15.97 และการปนเปื้อนหลังเสร็จสิ้นการปฏิบัติงานร้อยละ 40.97 ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการในช่วงระยะเวลาที่ทดสอบมีความปลอดภัยต่อการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* และพบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus spp.* โดยห้องปฏิบัติการมีการกำหนดแผนเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่ระหว่างเวลาปฏิบัติงานด้วยการเพิ่มมาตรการทำความสะอาด ได้แก่ หลอดรังสี UV เครื่องฆ่าเชื้อด้วยสารโอโซน แอลกอฮอล์ 70% ที่บริเวณพื้นที่ปฏิบัติงานและผู้ปฏิบัติงาน

59311305 : Major (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

MISS THIPPHAWAN THONGDONMUEAN : THE STUDY OF *BACILLUS CEREUS*CONTAMINATION IN VIRUS LABORATORY FACULTY OF VETERINARY THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR DR. PORNTHIP SRIDANG

This study was aimed to investigate the contamination of *Bacillus cereus*, a bacterial specie. The sampling area was Virus Laboratory workspaces, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University. This laboratory has working scope of virus isolation, cell culture and animal virus diagnosis. The samples were collected from 7 working space areas and 5 hands of persons corresponding to total 12 sampling points with the frequency of sampling 4 times per month. The total samples were 12 times per sampling points with 144 samples collecting before working time and after finish working day. The sterile cotton swab technique was used for collecting sample from workspace surface and person's hands then proceeded the specimens to bacterial culture using Blood agar and MacConkey agar. In addition chromogenic MYP agar as the specific media, special staining as Gram staining, McFarland method and biochemical test were used. for identifying *Bacillus cereus*. The results showed that *B. cereus* was not detected from all samples but the majority of contamination was found the other bacteria which was *Staphylococcus spp.* a board group bacteria that some species can cause toxin. The contamination of space before working time was 15.97 percent while after finish working day was increased with 40.97 percent. During this study the laboratory was safe from *Bacillus cereus* contamination while it was risk to contaminate the other group of bacteria of *Staphylococcus spp.* Thus, the result also revealed that the laboratory should set the policy measure for proper sanitizing such as cleaning persons with 70% alcohol and cleaning workspace with/or ozone releasing device or ultraviolet for controlling bacteria contamination of workspaces and persons

กิตติกรรมประกาศ

สารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ ศรีแดง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้วิจัย รวมทั้ง อาจารย์ดาวรุ่ง สังข์ทองประธานกรรมการสอบสารนิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มานะกร สุขมาก ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ส่งผลให้สารนิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของทุกท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำและประสบการณ์อันมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณ คุณสุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ นักวิจัยที่ปรึกษา ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับข้อแนะนำในการปฏิบัติงานวิจัย ขอบคุณเพื่อนร่วมงานห้องปฏิบัติการไวรัส และห้องปฏิบัติจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติค้นคว้าวิจัยขอขอบพระคุณเจ้าของหนังสือ วารสาร เอกสาร วิทยานิพนธ์ และสารนิพนธ์ ทุกเล่ม ที่ช่วยให้สารนิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณทัศนีย์ กาญจนศรี ที่กรุณาเป็นผู้ประสานงานด้านต่าง ๆ และตรวจแก้ไขการพิมพ์ และทำให้ การดำเนินงานจัดทำสารนิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณวิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ ผู้รับผิดชอบห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความสนับสนุนในการเก็บข้อมูลการวิจัยตลอดจนให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานจนส่งผลให้งานวิจัยและสารนิพนธ์ลุล่วงด้วยดี

คุณค่าหรือประโยชน์อันเกิดจากสารนิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาแด่พระคุณบิดา มารดา ครูอาจารย์ที่อบรม สั่งสอน และแนะนำให้การสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

นางสาว ทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

1.3 สมมติฐานของการศึกษา 2

1.4 ขอบเขตของการศึกษา 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 จุลชีพ 4

2.1.1 โปรคารีโอต 4

2.1.2 เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส 8

2.1.3 ไวรัส 11

2.1.4 Staphylococcus spp. 12

2.2 กิจกรรมปฏิบัติการและองค์ประกอบของห้องปฏิบัติการ 13

2.2.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัสในสัตว์ 19

2.3 ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลชีพในงานเพาะแยกเชื้อไวรัสในสัตว์ 21

2.3.1 จากตัวอย่างที่ส่งตรวจ 21
2.3.2 การปนเปื้อนที่เกิดจากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเพาะแยกไวรัส 23
2.3.3 การปนเปื้อนที่เกิดจากผู้ปฏิบัติงาน 23
2.4 รูปแบบการปนเปื้อน 24
2.4.1 การปนเปื้อนทางกายภาพ (physical contamination) 24
2.4.2 การปนเปื้อนทางเคมี (chemical contamination) 24
2.4.3 การปนเปื้อนทางจุลินทรีย์ (microbiological contamination) 24
2.5 ผลของการปนเปื้อน 25
2.6 การจัดการป้องกันการปนเปื้อน 25
2.7 งานวิจัยวิจัยที่เกี่ยวข้อง 26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 31
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 31
3.1.1 วัสดุป้องกันส่วนบุคคล 31
3.1.2 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเชื้อ 31
3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 31
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ 32
3.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 32
3.2.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด 32
3.2.2 วิธีการเตรียมอาหารเหลว 32
3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย 33
3.3.1 การเก็บและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไวรัส 33
3.3.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อ *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส 34
3.3.3 การเพาะเชื้อ Bacillus cereus 35

3.3.4 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย 36
3.3.5 การจำแนกเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธีทางชีวเคมี 37
3.3.6. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธีวัดแมคฟาร์แลน 37
3.3.7 นำผลวิเคราะห์เสนอต่อผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องเพื่อประชุมหาแนวทางแก้ไข 38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผลการทดลอง 39
4.1 ผลการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานของห้องปฏิบัติการไวรัส 39
4.2 ผลของการสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อ *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส 42
4.3 การปนเปือนเชื้อ *Bacillus cereus* โดยจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี 43
4.4 ผลวิเคราะห์และแนวทางแก้ไข 50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 53
รายการอ้างอิง 54
ประวัติผู้เขียน 56

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้จำแนก Bacillus cereus ออกจาก Bacillus spp..... 10

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบสมบัติของไวรัสกับจุลชีพต่าง ๆ..... 11

ตารางที่ 3 พื้นที่และจำนวนในการเก็บตัวอย่าง..... 35

ตารางที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างก่อนปฏิบัติงานและหลังปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส เดือนธันวาคม45

ตารางที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างก่อนปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส เดือนมกราคม 46

ตารางที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างหลังปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส เดือนกุมภาพันธ์ n..... 48

ตารางที่ 7 ความถี่ของการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus cereus และ Staphylococcus spp.จากตัวอย่างก่อนการปฏิบัติงาน และหลังการปฏิบัติงาน ภายในห้องปฏิบัติการไวรัส..... 49

ตารางที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อ Staphylococcus spp. หลังจากทำความสะอาดภายในห้องปฏิบัติการไวรัส 52

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ชนิดและรูปร่างของแบคทีเรีย 7

รูปที่ 2 ตู้บ่มเชื้อ และเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) 13

รูปที่ 3 เครื่องเตรียมสารเลี้ยงเชื้อ (laminar flow) 14

รูปที่ 4 เครื่องอุ่นสารละลาย (water bath) 14

รูปที่ 5 เครื่องกวนสารละลาย (stirrer) 15

รูปที่ 6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) 15

รูปที่ 7 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerator) -80°C (ก) ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ-20°C (ข) และ ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4°C (ค) 16

รูปที่ 8 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) 16

รูปที่ 9 เครื่องชั่งสาร (weighing scale) 17

รูปที่ 10 ถุงมือยาง (ก) และ หน้ากากอนามัย (ข) 17

รูปที่ 11 หลอดเก็บตัวอย่าง15ml,50ml (ก) และ กระบอกฉีดยา (syringe) (ข) 17

รูปที่ 12 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (automatic pipette) (ก) และ ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) (ข) 18

รูปที่ 13 เข็ม (needle) (ก) และกระดาษกรอง (filter membrane) (ข) 18

รูปที่ 14 ทิป (tip) (ก) และน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture media) (ข) 18

รูปที่ 15 ขวดแก้วต่าง ๆ (ก) และโกร่งบดตัวอย่าง (moltar) (ข) 19

รูปที่ 16 การบดตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ส่งตรวจเพื่อการเพาะแยกไวรัส 22

รูปที่ 17 ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการไวรัส สวมเสื้อกาวน์ ถุงมือ หมวก หน้ากากเพื่อป้องกันการสัมผัสเชื้อ จุลชีพอื่นในระหว่างปฏิบัติงาน 23

รูปที่ 18 ผลการเจริญของ Bacillus cereus ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar 36

รูปที่ 19 ชุดสีย้อมแกรม 37
รูปที่ 20 เครื่องวัดแมคฟาร์แลน (McFarland) 38
รูปที่ 21 แผนผังแสดงตำแหน่งที่ตั้งของห้องต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการไวรัส 39
รูปที่ 22 จุดเก็บตัวอย่างในห้องชั่งสารและล้างทำความสะอาด 40
รูปที่ 23 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส1 40
รูปที่ 24 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส2 41
รูปที่ 25 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส 3 41
รูปที่ 26 ผลการเจริญของ Staphylococcus spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar 42
รูปที่ 27 ลักษณะของเชื้อ Staphylococcus spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 43
รูปที่ 28 การทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างควบคุมผลบวกของเชื้อ Bacillus cereus 43

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาการปนเปื้อนของจุลชีพในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยนักวิทยาศาสตร์ จุลชีพหลายชนิดสามารถทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ค่าความเป็นกรด ความเป็นด่าง ทั้งในสภาพไร้ออกซิเจน และใช้ออกซิเจน ตลอดจนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อจุลชีพจากห้องปฏิบัติการมีข้อมูลยืนยันว่าเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยมีรายงานการปนเปื้อนเชื้อทางอากาศ และหยดของเหลวที่มีเชื้อจุลชีพในห้องปฏิบัติการมีข้อมูลเกี่ยวกับความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนตามบริเวณพื้นผิวของห้องปฏิบัติการหรือบริเวณที่ปฏิบัติงาน อีกทั้งการกำจัดหรือลดการปนเปื้อนด้วยยาฆ่าเชื้อเป็นไปได้ยาก มีข้อมูลเพียงจำนวนน้อยเกี่ยวกับการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ (แบคทีเรีย) จากมือของคนทำงานในขณะที่การเพาะแยกเชื้อ หรือระหว่างอ่านผลในห้องปฏิบัติการ โดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคบิดหรือมีอาการท้องร่วงอย่างแรง เชื้อจุลชีพที่มีรายงานว่ามีการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการในกลุ่มที่ทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้ปฏิบัติงาน ยังทำให้ผลการตรวจนั้นมีความผิดไปจากความเป็นจริง ได้ผลลบหรือผลบวกลวง เช่น ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาจมีการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพ หรือแบคทีเรียอื่นนอกเหนือจากที่มีในตัวอย่างที่ส่งตรวจก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามการติดเชื้อจุลชีพหรือการปนเปื้อนเชื้อบางชนิดมีข้อมูลยืนยันว่าเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยด้านจุลชีววิทยา อีกทั้งยังมีรายงานการติดเชื้อระบาดวิทยา รายงานการปนเปื้อนเชื้อทางอากาศ และหยดของเหลวที่มีเชื้อจุลชีพในห้องปฏิบัติการ นับเป็นเรื่องที่น่าวิตกกังวลต่อผู้ปฏิบัติงาน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ 2544)

สำหรับการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนนั้น ห้องปฏิบัติการนี้มีลักษณะงานที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างจากสัตว์ ซึ่งมีความหลากหลายทางสปีชีส์ (species) เช่น สัตว์เลี้ยง (แมว กระต่าย สุนัข) สัตว์เศรษฐกิจ (สุกร) สัตว์ปีก (ไก่ เป็ด) สัตว์น้ำ (กุ้ง ปลา) สัตว์ใหญ่ (โค กระบือ แพะ แกะ) เป็นต้น ตัวอย่างจากอวัยวะต่าง ๆ ต้องนำมาผ่านกระบวนการที่ใช้วัสดุอุปกรณ์ รวมทั้งเทคนิคที่ปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยผู้ปฏิบัติงานเองจำเป็นต้องสวมใส่ถุงมืออนามัย หมวก และหน้ากากอนามัย อย่างไรก็ตาม จากผลการปฏิบัติงานเพาะแยกไวรัสโดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดเซลล์ปฐมภูมิที่เตรียมจากเนื้อเยื่อ เลือด ผิวหนัง หรือขน อาจเกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียจากการปนเปื้อนเชื้อ

จุลชีพเนื่องจากการสัมผัสมือของผู้ปฏิบัติงานและแพร่ไปยังสิ่งแวดล้อม โดยการปนเปื้อนนั้นเป็นที่น่ากังวลว่าอาจนำไปสู่การปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพชนิดอื่นที่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน Aaebtu, (2005) และมีความสำคัญต่อการปฏิบัติงาน ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดไวรัสที่เพาะแยกเชื้อ และส่งผลเสียต่อการปฏิบัติงาน ซึ่งจากการทบทวนข้อมูลใน ห้องปฏิบัติการไวรัสจากการสุ่มตรวจ พบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และ *Staphylococcus* spp.ภายในห้องปฏิบัติการไวรัส จึงเป็นที่มาของศึกษาแห่งกำเนิดการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส ข้อมูลที่ได้นำมาเป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* เพื่อสุขลักษณะที่ดีของผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อระบุแหล่งปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* จากตัวผู้ปฏิบัติงาน วัสดุวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พื้นที่ผิวสัมผัสของห้องปฏิบัติการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2.2 เพื่อสำรวจการปนเปื้อนเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย ชนิดอื่นๆ เช่น กลุ่ม *Staphylococcus* spp. จากตัวผู้ปฏิบัติงาน วัสดุวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พื้นที่ผิวสัมผัสของห้องปฏิบัติการที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2.3 เพื่อกำหนดแนวทางการป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อในกลุ่ม *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ชนิด *Bacillus cereus* มีความสัมพันธ์หรือมาจากตัวผู้ปฏิบัติงาน วัสดุวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พื้นที่ผิวสัมผัสของห้องปฏิบัติการในช่วงเวลาก่อน ระหว่าง และภายหลังเลิกปฏิบัติงาน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อน *Bacillus cereus* ภายในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากตัวผู้ปฏิบัติงาน วัสดุวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ พื้นที่ผิวสัมผัสของห้องปฏิบัติการในช่วงเวลาก่อนและภายหลังเลิกปฏิบัติงาน มาจำแนกเชื้อกลุ่ม *Bacillus cereus* ที่ปนเปื้อน ซึ่งสามารถสรุปขอบเขตการวิจัยดังนี้

1.4.1 การวิจัยนี้ได้เลือกห้องปฏิบัติการสำหรับเก็บตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มด้วยวิธีการ swab บนพื้นที่ผิวบริเวณที่ปฏิบัติงาน วัสดุ (ถุงอนามัย หลอดเก็บตัวอย่าง ภาชนะเลี้ยงเชื้อ) และอุปกรณ์ (ตู้บ่มเชื้อ เครื่องชั่งสาร เครื่องกวนสารละลาย) ที่ผู้ปฏิบัติงานสัมผัสขณะปฏิบัติงาน นอกจากนี้เก็บตัวอย่างจากการปนเปื้อนบนมือของผู้ปฏิบัติงาน ทำการเก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ.2562 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2563 ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 2 ครั้ง ครั้งละ 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) ทำการเก็บตัวอย่างขณะก่อนปฏิบัติงาน และหลังปฏิบัติงาน ในห้องปฏิบัติการไวรัสจำนวน 3 ห้อง จากจำนวนห้องทั้งหมด 6 ห้อง เนื่องจากแต่ละห้องมีลักษณะการใช้งานที่แตกต่างกัน ห้องปฏิบัติการที่เลือกเป็นห้องที่มีการปฏิบัติงานจริงในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่ถูกส่งมาตรวจ ซึ่งมีโอกาสในการปนเปื้อน *Bacillus cereus* สูง ส่วนอีก 3 ห้องที่ไม่ได้เลือกในการเก็บตัวอย่างนั้น เนื่องจากเป็นห้องพักสำหรับผู้ปฏิบัติงานและห้องเก็บวัสดุ อุปกรณ์ จึงมีโอกาสในการปนเปื้อน *Bacillus cereus* ต่ำ

1.4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus cereus* ประกอบด้วยวิธี ดังนี้ เลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) และนำไปสู่การทดสอบหาค่าทางชีวเคมี (biochemical activity test) และวัดความขุ่นในหน่วย แมคฟาร์แลนด์ เพื่อดูปริมาณเชื้อ *Bacillus cereus*

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบสาเหตุการปนเปื้อน ของเชื้อบาซิลลัสซีเรียส (*Bacillus cereus*) จากแหล่งกำเนิดภายในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

1.5.2 ได้แนวทางการป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อในกลุ่ม *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลชีพ

จุลชีพ หรืออาจเรียกว่าจุลินทรีย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก ๆ และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจึงจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์บางชนิดช่วยในการสังเกต เช่น กล้องจุลทรรศน์ จุลชีพประกอบด้วยเซลล์เดียว (unicellular) หรือหลายเซลล์ (multicellular) แต่เซลล์เหล่านั้นต่างเป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน และมีรูปร่างเหมือนกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เพื่อทำหน้าที่เฉพาะเหมือนในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามประเภทของเซลล์ คือ โปรคารีโอต (prokaryote) และยูคารีโอต (eukaryote) (ศิริพรรณ สารินทร์ 2550) โดย

2.1.1 โปรคารีโอต (Prokaryote)

คือ จุลินทรีย์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เช่น แบคทีเรีย(bacteria) และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นต้น (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555) แบคทีเรีย (Bacteria) ตัวอย่างของจุลชีพนอกจากแบคทีเรียรา แล้วยังมีจุลชีพชนิดอื่น เช่น ยีสต์ (yeast) ไวรัส (virus) และไวรอยด์ (viroid) เป็นต้น จุลชีพสามารถพบได้ในหลายสภาวะแวดล้อม เช่น บริเวณที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูงมาก ๆ ในบ่อน้ำพุร้อนที่มีความร้อนสูงมาก (ศิริพรรณ สารินทร์ 2550) จุลชีพทั้งหมดที่สำคัญแล้วสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมคือแบคทีเรียซึ่งเป็นจุลชีพที่มีขนาดเล็กมากไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูงส่อง ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว และเป็นพวกโปรคารีโอต มีผนังเซลล์ที่คงรูป (rigid cell wall) ทำให้แบคทีเรียรักษารูปร่างได้ แบคทีเรียมีรูปร่างได้หลายแบบ มีเพศและไม่มีเพศ โดยแบบมีเพศเกิดจากการรวมตัวของเซลล์ 2 เซลล์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยทั่วไปเป็นแบบ binary fission บ้างก็เป็นการแตกหน่อ (budding) แบคทีเรียสามารถพบได้ทั่ว ๆ ไปไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ อากาศ มีทั้งชนิดที่ให้ประโยชน์และบางชนิดก็เป็นโทษ ตัวอย่างของแบคทีเรีย เช่น Bacillus spp. Lactobacillus spp. Streptococcus spp. Staphylococcus spp. Escherichia coli Proteus vulgaris Spirillum spp. และ Streptomyces spp. เป็นต้น โดยชนิดและรูปร่างของแบคทีเรียรูปที่ 1 และโดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ อาณาจักรย่อยอาเคียแบคทีเรีย (Subkingdom Archaebacteria) และอาณาจักรย่อยยูแบคทีเรีย (Subkingdom Eubacteria) โดยแต่ละกลุ่มมีรายละเอียดดังนี้ (Adams, M. R. and M. O. Moss,1995.)

(1) อาณาจักรย่อยอาเคียแบคทีเรีย (Subkingdom Archaebacteria) เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะพิเศษ คือ สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตอื่นได้ เช่น ในสภาพที่มีแก๊สมีเทน (methane) หรือสภาพไร้อากาศ (anaerobic) ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่พบ

ในบึงที่น้ำไม่ไหลถ่ายเท ในกระเพาะวัว เป็นต้น เราสามารถนำแบคทีเรียพวกนี้มาใช้ผลิตแก๊สชีวภาพเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ พวกที่อยู่ในที่มีความเค็มสูง เช่น แบคทีเรียที่พบใน Salt Lake ของประเทศอเมริกา และใน Dead Sea ของประเทศอิสราเอล แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมีได้ ซึ่งจัดเป็นผู้ผลิตแบบที่มีการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic bacteria) **(2) อาณาจักรย่อยยูแบคทีเรีย (Subkingdom Eubacteria)** เป็นแบคทีเรียพบทั่ว ๆไป มีทั้งที่เป็นประโยชน์ และทำให้เกิดโทษต่อมนุษย์ สัตว์ พืช สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

กลุ่มโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) เป็นยูแบคทีเรียแกรมลบที่พบมากที่สุด บางกลุ่มสังเคราะห์แสงได้ เช่น เพอร์เพิลซัลเฟอร์แบคทีเรีย และแบคทีเรีย *Rhizobium spp.*ในปมรากพืชตระกูลถั่ว)

กลุ่มคลาไมเดีย (Chlarmydia) เป็นยูแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นปรสิตในเซลล์สัตว์และก่อให้เกิดโรคติดต่อทางเพศ เช่น โกโนเรีย (หนองใน) (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555)

กลุ่มสไปโรคีท (Spirochetes) เป็นยูแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นรูปเกลียว มีทั้งดำรงชีพอิสระและบางชนิดเป็นสาเหตุของโรคซิฟิลิส และโรคฉี่หนู (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555)

แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เป็นยูแบคทีเรียที่พบทั่วไปในดินและอากาศ บางชนิดใช้ผลิตเนย ผักดอง และนมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ต บางชนิดใช้ผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น *Steptomyces spp.* เช่น สเตรปโตมัยซิน และเตตร้าไซคลิน เป็นต้น บางชนิด เช่น *Bacillus spp.* สามารถผลิตสปอร์ภายในหรือเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และบางชนิด เช่น *Bacillus anthracis* ทำให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ หมายเหตุการณ์สร้างเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียไม่จัดเป็นการสืบพันธุ์ เพราะแบคทีเรีย 1 เซลล์จะสร้างเพียง 1 เอนโดสปอร์ เมื่อเอนโดสปอร์งอก แบคทีเรียเซลล์เดิมจะแตกออกและตายไปไม่มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย แกรมบวกบางชนิด เช่น *Clostridium tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก *Mycobacterium tuberculosis* ทำให้เกิดวัณโรคแบคทีเรียแกรมบวกอีกกลุ่มหนึ่งไม่มีผนังเซลล์ มีเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นไขมัน ได้แก่ ไมโคพลาสมา (mycoplasma) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กสุดเพียง 0.2-0.3 ไมครอน ไมโคพลาสมาบางชนิด เช่น *Mycoplasma pneumoniae* เป็นสาเหตุของโรคปวดบวมในคนและวัว บางชนิดทำให้เกิดโรคในพืช เช่น Spiroplasma ทำให้เกิดโรคในส้ม

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) เป็นยูแบคทีเรียที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ นักอนุกรมวิธานบางท่านจัดเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algue) ในไฟลัม ไซยาโนไฟตา (cyanophyta) มีสารสีที่สำคัญได้แก่ คลอโรฟิลล์ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) และแคโรทีนอยด์ อยู่ในถุงแบนๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (thylakoid membrane) พบทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำพุร้อน และภายใต้น้ำแข็งในมหาสมุทร นอกจากไซยาโนแบคทีเรีย จะสังเคราะห์ด้วยแสงได้แล้ว บางชนิดเช่น แอนาบีนา (*Anabaena spp.*) นอสตอก (*Nostoc spp.*) ที่อยู่ในแหนแดงและออสซิลลาทอ

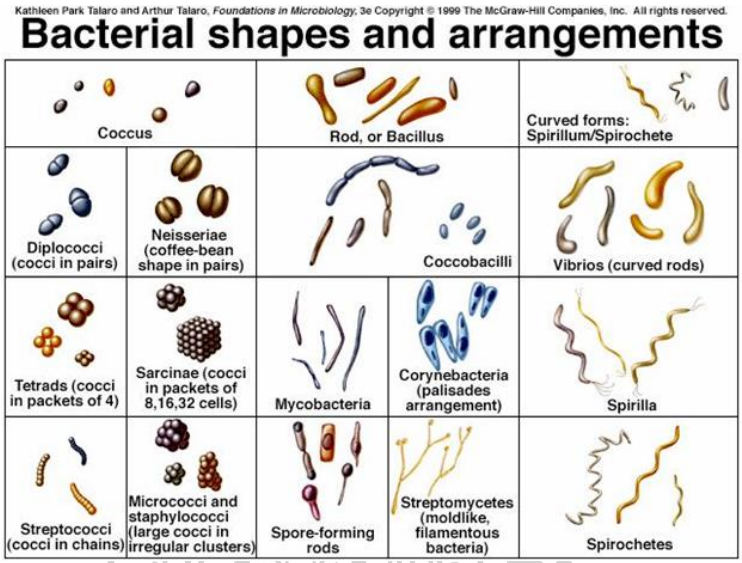
เรีย(*Oscillatoria spp.*) สามารถตรึงไนโตรเจนมาเป็นสารประกอบไนเตรตได้เป็นผู้ผลิตในระบบนิเวศน์เปลี่ยนไนโตรเจนเป็นสารประกอบแอมโมเนีย เช่น Anabaena, Nostoc จัดเป็นอาหารเพราะมีโปรตีนสูง เช่น สาหร่ายเกลียวทอง (spirulina) (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555) พวกยูแบคทีเรีย (eubacteria) แบ่งตามคุณสมบัติการย้อมสีเป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) แบคทีเรียแกรมลบ (gram negative eubacteria) เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแดงของซาฟรานิน โอ (safranin O) เนื่องจากมีชั้นของสารประกอบไขมันและคาร์โบไฮเดรต (lipopolysaccharides) ทำให้ไม่ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สำคัญ เช่น Spirochaete อยู่ในน้ำในโคลน ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้ *E. coli* อยู่ในลำไส้อุจจาระ น้ำทิ้ง (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555)

(2) แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive eubacteria) เป็นแบคทีเรียที่มีผนังเซลล์หนา ประกอบด้วย peptidoglycan แต่ไม่มีเยื่อสารประกอบไขมันและคาร์โบไฮเดรตหุ้มภายนอกเหมือนกลุ่มแรก จึงย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต ตัวอย่างเช่น *Staphylococcus* พบบนผิวหนังของคน *Streptococcus lactis* ใช้ทำนมเปรี้ยวจากการศึกษาที่ผ่านมาโดยนักวิทยาศาสตร์

มีแบคทีเรียหลายชนิดสามารถทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่เลวร้าย ค่าความเป็นกรด ด่างกว้าง สภาพไร้ออกซิเจน และใช้ออกซิเจน ตลอดจนอุณหภูมิที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจมีความเป็นไปได้ที่เราจะพบการปนเปื้อนแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ซึ่งมีความสะอาด และมีการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ โดยสภาพแวดล้อมนี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อต่าง ๆ ก็ตาม แต่เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลชีพที่มีความหลากหลาย และทนทานสูงดังนั้นจึงอาจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียบางชนิดที่มีความทนทานต่อสารฆ่าเชื้อ และอุณหภูมิสูง (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ 2555) มีตัวอย่างของแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูงเช่น น้ำพุร้อน นักวิทยาศาสตร์ได้ใช้ประโยชน์ดังกล่าวคือ แบคทีเรีย ชนิด Thermus aquaticus *T. (Thermus aquaticus*) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของเอนไซม์ *Taq* Dna polymerase ที่ใช้ในงานสังเคราะห์ดีเอนเอถึงเห็นได้ว่าจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียมีหลายชนิด รูปร่างต่างกัน เช่นรูปร่างกลม (coccus) ได้แก่กลุ่ม*Streptococci*, *Staphylococcus spp.* รูปร่างเป็นแท่ง (rod) เช่นกลุ่ม *Bacillus spp.* รูปร่างโค้งงอหรือเกลียว (curved forms) เช่นกลุ่ม *Vibrio spp*. มีการเรียงตัวต่างกัน มีการเรียงตัวเป็นกลุ่มก้อน (colony)หรือแบบเดี่ยว ๆ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบบอ้างอิงการสร้าง หรือไม่สร้างสปอร์ ตัวอย่างการจำแนกแบคทีเรียแสดงดังรูปที่ 1 แบคทีเรียจึงเป็นจุลชีพที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ แต่ยังมีหลากหลายชนิดที่เป็นประโยชน์เช่นกัน สำหรับงานศึกษานี้มีสนใจในการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย ชนิดบาซิลลัส ซีเรียส *(Bacillus cereus)* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อันตรายต่อมนุษย์ และสุขภาพของผู้ปฏิบัติงานใน

ห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่มีการสัมผัส



รูปที่ 1 ชนิดและรูปร่างของแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2.1.2 เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*)

(1) ลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อแบคทีเรีย ชนิดแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod) เจริญได้ดีในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ พบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ในฝุ่น ดิน อากาศ และอาหารสำเร็จรูป มักพบว่าเป็นสาเหตุของอาการท้องร่วงในคน *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างสารพิษ ชนิด enterotoxin ซึ่งมีสารพิษ 2 ชนิด คือ สารพิษชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea enterotoxin) และสารพิษที่ทำให้อาเจียน (enteric toxin) เมื่อได้รับสารพิษจากเชื้อนี้จะไปทำลายเยื่อบุผนังเซลล์ให้เกิดรูพรุน มีผลทำให้เซลล์ตาย อวัยวะเป้าหมายของสารพิษคือเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ เมื่อเซลล์ตายจึงเกิดของเหลวต่าง ๆ ไหลออกมา จึงเป็นอาการของการเกิดท้องร่วง คลื่นไส้ ปวดท้อง อาเจียน อย่างเฉียบพลันเกิด อาการภายใน 1-6 ชั่วโมง หลังบริโภค อนึ่ง สารพิษมักพบการปนเปื้อนด้วยลักษณะที่อยู่ในรูปสปอร์ ที่เจริญต่อไปเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างปกติ (vegetative cell) ปริมาณเชื้อที่ก่อโรคในอาหาร มากกว่า 10^6 เซลล์/กรัม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ 2544)

(2) แหล่งที่พบและสาเหตุการเกิดโรค เชื้อ *Bacillus cereus* สามารถพบได้ในอาหารทั่วไปตัวอย่าง เช่น เนื้อสัตว์ นม ผัก ทำให้เกิดอาการท้องร่วงจากอาหารเป็นพิษ การระบาดของโรคเนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อในอาหารจากผลิตภัณฑ์ข้าว และอาหารจำพวกแป้งอื่น ๆ เช่น มันฝรั่ง พาสต้าและผลิตภัณฑ์เนยแข็ง รวมทั้งอาหารปรุงแต่ง เช่น ซอส พุดดิ้ง ซุป ลูกชิ้น พาย และสลัด

(3) อาการของโรค อาการที่เกิดเหมือนกับอาการท้องร่วงที่เกิดจากการได้รับเชื้อ *Clostridium perfringens* คือ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีอาการปวดเกร็งที่ช่องท้อง ซึ่งจะเกิดภายใน 6-15 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน อาจมีอาการคลื่นไส้พร้อม ๆ กับปวดท้องแต่ อาการอาเจียนเกิดขึ้นไม่บ่อยนักอาการของโรคจะยังคงอยู่นานที่สุด 24 ชั่วโมง อาหารเป็นพิษชนิดที่ทำให้เกิดอาการอาเจียนจะมีลักษณะเฉพาะ คือ มีอาการคลื่นไส้ และอาเจียนภายในเวลา 5-6 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน (ปิยะวรรณ กาสลัก.2540)

(4) การป้องกัน ทำได้โดยการเก็บอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7°C หรือเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 55-60°C และควรจะมีการอุ่นอาหารที่เก็บไว้ก่อนที่จะน้ามารับประทานเสมอ เพื่อป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อชนิดนี้

(5) การเพาะแยกเชื้อ *Bacillus cereus* เจริญได้ในจานเพาะเลี้ยง โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Bacillus* เรียกว่า chromogenic color ชนิด MYP ลักษณะโคโลนี เป็น สีชมพู-ส้ม ซึ่งการเจริญในอาหารชนิดนี้ไม่สามารถแยกสปีชีส์ จากเชื้อ *Bacillus* ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น *Bacillus. Anthracis Bacillus thuringiensis Bacillus. mycoides* และ *Bacillus. weihenstephanensis* ดังนั้น การแยกเชื้อ *Bacillus cereus* จึงใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมี (biochemical activity test) เป็นการแยกสปี

ชีส์ของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ออกจากกัน เป็นวิธีที่มีความจำเพาะในการแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งจัดเป็นวิธีที่มาตรฐาน (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ 2555)

ตารางที่ 1 การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้จำแนก Bacillus cereus ออกจาก Bacillus spp.

Species	Motility	Urease	Citrate	Starch Hydrolysis	Gelatinase	Nitrate Reduction	Growth at 65 °C	Acid production			VP
								Glucose	Arabinose	Mannitol	
B.anthracis	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
B. subtilis	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
B.cereus var.	+									+	
mycoides	-		+	+	+	+	-	+		-	+
B.megaterium	+	-	+	+	(+)	-	-	+	+	-	-
B.sterothermo	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
B.licheniformis	+	-	+	+	+	+	-	+	+		+
B.lentus	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B.firmus	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
B.coagulans	+	-	-	+	-	V	-	+	V	V	V
B.pumilus	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+

ปรับปรุงมาจาก: เฉลิมเกียรติ แสงทองพินิจ (2553)

2.1.3 ไวรัส (agent or entity)

นิยามศัพท์เฉพาะ ไวรัส คือรูปธรรมอันหนึ่งที่เล็กที่สุดที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อ (infection) ประกอบด้วยยีนซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิคชนิด DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง กับโปรตีนที่หุ้มรอบกรดนิวคลีอิคและของอนุภาคไวรัสจะเกิดขึ้นเฉพาะภายในเซลล์ โดยมีส่วนประกอบของเซลล์เจ้าบ้านมาช่วยในการสังเคราะห์องค์ประกอบของไวรัส ไวรัสมีขนาดประมาณ 20-30 นาโนเมตรซึ่งวัดได้จากการกรองผ่าน (gradocol membrane) หรือวัดขนาดได้โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (เมื่อเปรียบเทียบกับจุลชีพอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส มีขนาดเล็กกว่าหลายเท่า และสามารถผ่านตัวกรองแบคทีเรียได้การตรวจวินิจฉัยไวรัสในสัตว์ มีวิธีการที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในสัตว์ทางห้องปฏิบัติการอยู่หลายวิธี เช่น การตรวจทางอิมมูโนวินิจฉัย การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) โดยพิจารณาจากลักษณะวิการจากอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ที่เสียชีวิตแล้ว การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววินิจฉัย (molecular biology) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเพาะแยกไวรัส (Virus isolation) ในเซลล์เพาะเลี้ยงนับเป็นวิธีการมาตรฐาน (gold standard) ซึ่งเป็นที่ยอมรับในการวินิจฉัยโรคสัตว์ที่เกิดจากเชื้อไวรัสหลายชนิดซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ได้ ตัวอย่างเชื้อไวรัสในสัตว์ เช่น ไวรัสไข้หวัดนก พิษสุนัขบ้า (Butter,1991:Brian and Hilar,1996) โดยสามารถเปรียบเทียบสมบัติของไวรัสกับจุลชีพต่างๆ ได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบสมบัติของไวรัสกับจุลชีพต่าง ๆ

สมบัติ(properties)	แบคทีเรีย	ไมโคพลาสมา	ริกเกตเซีย	แคลมีเดีย	ไวรัส
เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	+	+	-	-	-
การแบ่งตัวแบบไบนารี่ (Binary fission)	+	+	+	+	-
สารพันธุกรรม DNA/RNA	+	+	+	+	+
ไรโบโซม(Ribosome)	+	+	+	+	-
เมตาบอลิซึม(Metabolism)	+	+	+	+	-
ความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Drug sensitivity)	+	+	+	+	-

ที่มา: http://organicmellow.blogspot.com/2013/08/blog-post_6.html

2.1.4 Staphylococcus spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบโครงสร้างเซลล์มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้น ๆ เป็นกิ่ง หรือเป็นลักษณะพวงองุ่น บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยใน (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุ 2558) มนุษย์ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ Staphylococcus นั้นมีชื่อเรียกคือ Staphyloenterotoxicosis และ Staphyloenterotoxemia

(1) แหล่งที่พบและสาเหตุการเกิดโรค เชื้อ *Staphylococcus spp.* ที่แพร่กระจายทั่วไป อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่างจำนวนมากได้ เชื้อจะมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งปฐมภูมิของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบอยู่ตามระบบทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผม และผิวหนังอาจพบเชื้อชนิดนี้ ได้ถึง 60-80% ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหาร รวมไปถึงขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่ง คือการเก็บ (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุ 2558) อาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่ แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษอย่างรวดเร็ว

(2) อาการของโรค ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อ *Staphylococcus spp.*นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็ว และรุนแรงในหลาย ๆ กรณี โดยทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร และปริมาณสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย อาการทั่วไปที่พบ คือ หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 2-4 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน เช่น ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ปวดหัวเป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุ 2558)

(3) การป้องกัน สามารถทำได้โดยอบรมให้ผู้ประกอบอาหารมีความรู้ และเห็นถึงความสำคัญของการรักษาความสะอาดในขณะปรุงอาหารเพื่อเป็นการลดโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อ ส่วนในการบริโภคนั้นให้รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุ 2558) หรือนำอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพียงพออย่างรวดเร็วหากยังไม่รับประทานในทันที เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อ และอุ่นอาหารให้ร้อนก่อนรับประทานทุกครั้ง

2.2 กิจกรรมปฏิบัติการและองค์ประกอบของห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการเป็นห้องซึ่งได้รับตัวอย่างที่มาจากการวินิจฉัยเบื้องต้นโดยสัตวแพทย์ โดยตัวอย่างที่ส่งตรวจยังห้องปฏิบัติการมาจากสัตว์ต่าง ๆ เช่น สัตว์เศรษฐกิจ สัตว์ใหญ่ สัตว์ป่า สัตว์ปีก สัตว์น้ำ และสัตว์เลี้ยง เป็นต้น โดยมีองค์ประกอบของห้องปฏิบัติการประกอบไปด้วย พื้นที่สำหรับเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน และตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และควบคุมแก๊ส เซลล์เจ้าบ้านนั้นเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยอาจผลิตขึ้นมาเองและที่มีทางการค้า นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีตู้เย็นที่เก็บตัวอย่าง โดยใช้อุณหภูมิต่ำ วัสดุวิทยาศาสตร์ที่มีความจำเพาะ และปลอดจากเชื้อจุลชีพอื่น ๆ (Freshney, 2016: Spier et al,1990)

รูปที่ 2 ตู้บ่มเชื้อ และเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)

รูปที่ 3 เครื่องเตรียมสารเลี้ยงเชื้อ (laminar flow)

รูปที่ 4 เครื่องอุ่นสารละลาย (water bath)

รูปที่ 5 เครื่องกวนสารละลาย (stirrer)

รูปที่ 6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

รูปที่ 7 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerator) -80°C (ก) ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ-20°C (ข) และ ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4°C (ค)

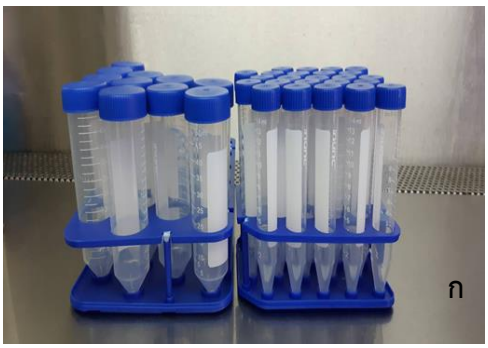
รูปที่ 8 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

รูปที่ 9 เครื่องชั่งสาร (weighing scale)

ก

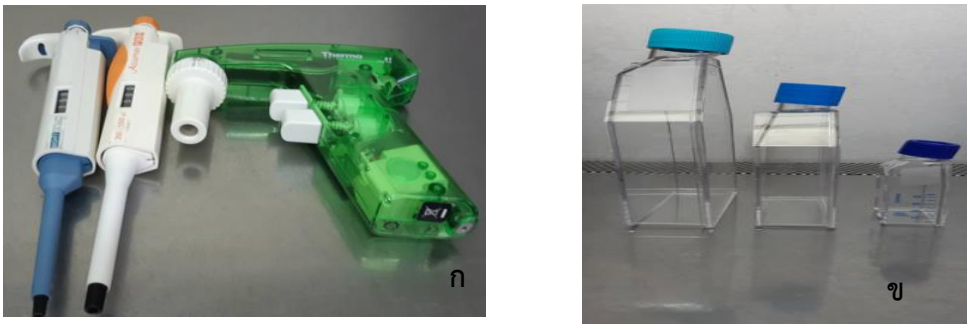
ข

รูปที่ 10 ถุงมือยาง (ก) และ หน้ากากอนามัย (ข)


ก

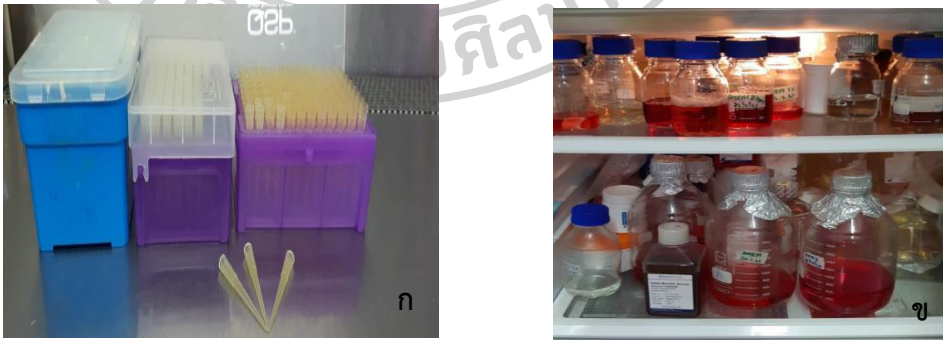
ข

รูปที่ 11 หลอดเก็บตัวอย่าง15ml,50ml (ก) และ กระบอกฉีดยา (syringe) (ข)

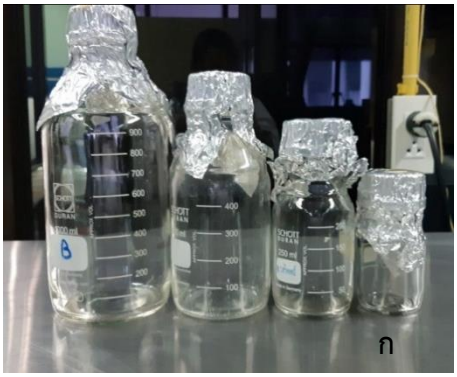


รูปที่ 12 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (automatic pipette) (ก) และ ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) (ข)

รูปที่ 13 เข็ม (needle) (ก) และกระดาษกรอง (filter membrane) (ข)



รูปที่ 14 ทิป (tip) (ก) และน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture media) (ข)


ก

ข

รูปที่ 15 ขวดแก้วต่าง ๆ (ก) และโกร่งบดตัวอย่าง (moltar) (ข)

2.2.1 การเพาะแยกเชื้อไวรัสในสัตว์ (Animal virus isolation)

เป็นงานที่ต้องมีวิธีจำเพาะซึ่งความสำคัญในการจำแนกชนิดของไวรัสโดยใช้การเพาะแยกในเซลล์เพาะเลี้ยง(cell culture) นับเป็นวิธีการมาตรฐาน (gold standard) ตามองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health หรือ Office International des Epizooties (OIE,2008) เป็นวิธีการที่มีความซับซ้อน ใช้เครื่องมืออุปกรณ์ วัสดุวิทยาศาสตร์ที่มีความจำเพาะต่องานมีมูลค่าสูง นอกจากนี้ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญการมีเทคนิคที่ปลอดเชื้อ ดังนั้นวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ จำเป็นต้องผ่านการฆ่าเชื้อจุลชีพโดยวิธีการ สเตอริไลซ์ (Sterilization) การทำให้อาหารปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อน (thermal processing) รังสี (irradiation) สารเคมี หรือวิธีทางกายภาพ เช่น การกรองด้วยเยื่อ (membrane filtration) เพื่อทำลายหรือกำจัดจุลินทรีย์ทั้งหมด รวมทั้งสปอร์ของแบคทีเรีย (bacterial spore) ทุกชนิด สำหรับการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้ออาหารระดับการสเตอริไลซ์ต้องใช้ความร้อนสูงเป็นเวลานานทำให้สูญเสียคุณภาพของอาหาร ทั้งคุณภาพทางประสาทสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการทั้งยังสิ้นเปลืองพลังงานมากทำให้ไม่คุ้มค่าที่ใช้ผลิตในเชิงการค้าเพื่อลดความรุนแรงของการฆ่าเชื้อระดับสเตอริไลซ์ลง ซึ่งทำให้สามารถปฏิบัติได้ในเชิงการค้าระดับอุตสาหกรรม จึงใช้ระดับการฆ่าเชื้อที่เรียกว่าการทำให้ปลอดเชื้อเพื่อการค้า (commercial sterilization) เครื่องนึ่งความดัน อุปกรณ์ที่ใช้ในการนึ่งฆ่าเชื้อก็คือเครื่องนึ่งความดัน (Autoclave) ชนิดของเครื่องนึ่งความดันที่นิยมใช้มี 2 แบบคือ เครื่องนึ่งความดัน ระบบ Gravity และเครื่องนึ่งความดันแบบมีระบบดูดให้เป็นสุญญากาศก่อนและหลังนึ่ง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) เครื่องนึ่งความดัน ระบบ Gravity คือเครื่องนึ่งความดันขนาดเล็กที่มีความจุไม่เกิน 20 ลิตร (มักใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ) มีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้ หากใช้อุณหภูมิ 121°C แรงดันไอน้ำจะเป็น 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และหากใช้อุณหภูมิ 134 °C แรงดันไอน้ำจะเป็น 30

ปอนด์/ตารางนิ้ว โดยอัตโนมัติ (เมื่อนึ่งในความดันบรรยากาศปกติ) ไม่จำเป็นต้องมีการไล่อากาศออกจากห้องนึ่งก่อนเพิ่มความดันด้วยไอน้ำ เพราะแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เพียงพอที่จะไล่อากาศออกให้หมดได้อยู่แล้วเครื่องนึ่งความดันระบบ gravity ที่ขายกันในท้องตลาดปัจจุบันมี 2 แบบ โดยดูจากวิธีการทำให้ของที่นึ่งแห้งเป็นหลัก ได้แก่

แบบเก่า : ระบบการทำให้แห้งใช้ความร้อนทำให้ของที่นึ่งแล้วแห้ง (Dry Heat) โดยใช้เวลาประมาณ30-60 นาที ดังนั้นวัสดุบางอย่างอาจมีลักษณะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปและทำให้อายุการทำงานสั้นลงอันเนื่องจากได้รับความร้อนนาน (ปัจจุบันไม่นิยมใช้กันแล้ว)

แบบใหม่ : ระบบการทำให้แห้งจะมีตัวดูดอากาศจากภายนอกที่เย็นกว่าเข้าสู่ห้องนึ่ง โดยผ่านแผ่นกรอง (bacterial filter) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน อากาศที่เย็นกว่าจะไล่อากาศและไอน้ำที่ร้อนกว่าซึ่งอยู่ภายในห้องนึ่งออกสู่ หม้อต้ม การใช้เวลาในการทำให้แห้งจึงสั้นกว่า แต่ความชื้นที่เกาะอยู่กับของที่นึ่งจะออกไปไม่หมด และจะต้องเปลี่ยนแผ่นกรองอยู่บ่อย ๆ เพราแผ่นกรองอาจจะตันจากอากาศที่ดูดเข้าไปได้

(2) เครื่องนึ่งความดันแบบมีระบบดูดให้เป็นสุญญากาศก่อนและหลังนึ่ง ระบบนี้จะมีหม้อนึ่งขนาดใหญ่ (มักใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม) จึงเกิดปัญหาจากขนาดของห้องนึ่งคือ แรงดันไอน้ำไม่สามารถไล่อากาศออกได้หมด ทำให้การนึ่งไม่ถึงระดับการฆ่าเชื้อตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องมีระบบดูดอากาศออกจากห้องนึ่งก่อนแล้วค่อยใช้แรงดันไอน้ำร้อนในการนึ่งเครื่องนึ่งความดัน ระบบนี้จะมีหม้อต้มให้เกิดไอน้ำ (steam boiler) แยกต่างหากไม่รวมอยู่ภายในห้องนึ่ง โดยจะฉีดไอน้ำทำให้ห้องนึ่งมีสภาวะความร้อนและแรงดันไอน้ำตามที่ต้องการได้ อย่างรวดเร็ว ช่วยให้อุปกรณ์ที่ผ่านการนึ่งมีอายุยาวนานกว่าการนึ่งด้วยเครื่องนึ่งความดันระบบ gravity เพราะของที่นึ่งแล้วจะสัมผัสความร้อนในช่วงเวลาที่สั้นกว่า อย่างไรก็ดีเครื่องนึ่งความดันระบบนี้เมื่อการนึ่งสิ้นสุดลงภายในห้องนึ่งจะมีสภาพเป็นสุญญากาศ ดังนั้น จึงต้องปล่อยให้อากาศภายนอกเข้าสู่ห้องนึ่งโดยผ่านแผ่นกรองก่อนจึงจะเปิดประตูได้ลักษณะของเครื่องนึ่งความดันที่ดี

1) อุณหภูมิที่ใช้สำหรับการนึ่งฆ่าเชื้อควรอยู่ในช่วง 105 – 123 ℃ สูงที่สุดไม่ควรเกิน134 ℃ แต่ไม่ควรให้น้อยกว่านี้

2) ความแม่นยำของอุณหภูมิควรอยู่ในช่วงไม่เกิน +/- 0.1 ℃

3) ความดันสูงสุดที่เครื่องนึ่งความดันทำได้ไม่ควรต่ำกว่า 26 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4) ระบบการปล่อยความดันออกควรจะมีแผ่นกรองเพื่อช่วยไม่ให้เกิดการปนเปื้อนจากภายนอกห้องนึ่ง

5) พื้นผิวภายในและภายนอกตู้ควรทำมาจากวัสดุที่ทนความร้อนได้สูง โดยเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสติก

6) มีระบบควบคุมความปลอดภัย (Safety Control) เพื่อป้องกันอุณหภูมิและความดันสูงเกินค่าที่ต้องการประโยชน์ของเครื่องนึ่งความดันนึ่งฆ่าเชื้อเครื่องมือ อุปกรณ์และของเสียที่เกิดการปนเปื้อนหรือติดเชื้อทางชีวภาพ (Biohazard): Autoclave ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนและแรงดันสูง โดยสิ่งที่สามารถนำมานึ่งฆ่าเชื้อนั้นได้แก่

• เครื่องมือที่เกิดการปนเปื้อน หรือเครื่องมือที่นำไปใช้เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์

• สิ่งเพาะเลี้ยงและหัวเชื้อที่เกิดการติดเชื้อหรือปนเปื้อนจาก แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส

• อุปกรณ์อื่นที่เกิดการปนเปื้อนเช่น กระดาษผ้า เสื้อผ้า ปีเปตทิปแบบพลาสติก ปีเปตแก้ว หลอดทดลองทั้งขนาดเล็กและใหญ่ (tube, vial) ถุงมือ และจานเพาะเชื้อที่ใช้แล้ว

• ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์ทั้งที่เกิดและไม่เกิดการติดเชื้อ

• ชิ้นตัวอย่างจากเซลล์พืชและสัตว์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมสิ่งที่ไม่ควรนำมานึ่งฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารแผ่รังสี พลาสติก โพลีเอทิลีนชนิดต่าง ๆ และสารละลายที่ระเหยได้หรือสารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อน เช่น ฟีนอล อีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม

2.3 ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลชีพในงานเพาะแยกเชื้อไวรัสในสัตว์

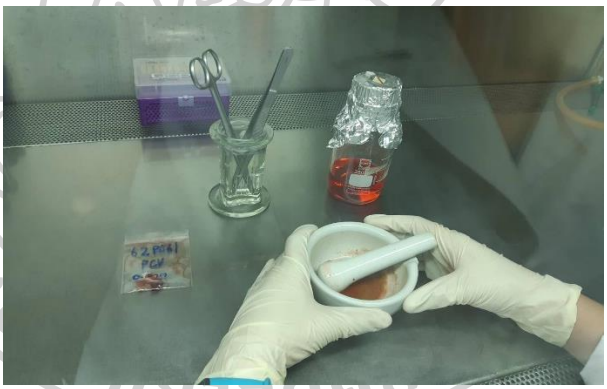
ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพอื่น อาจมาได้จากหลาย ๆ ปัจจัย เช่นจากตัวอย่าง โดยตัวอย่างนั้น ๆ มาจากการเก็บที่ไม่ปลอดเชื้อ และตัวอย่างนั้น มีจุลชีพที่เติบโตอยู่แล้ว การปนเปื้อนอันมาจากสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อาหารเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้านของไวรัส วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้มีการปนเปื้อนสารที่เป็นของเสียทางชีวภาพเป็นต้น และมีตัวแปรที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือผู้ปฏิบัติงานประจำ และบุคคลที่เกี่ยวข้องในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ มีหน้าที่หลักในการแยกเชื้อและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากสิ่งส่งตรวจให้กับหน่วยงานเช่นโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องรวมถึงงานบริการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับเซลล์และไวรัส ที่มีผู้รับบริการเป็นฟาร์มเกษตรกร บริษัทเอกชน และความร่วมมือกับหน่วยงานรัฐบาล เช่นกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช แหล่งที่มาของความเสี่ยงอาจจำแนกได้เป็น 3 แหล่ง ดังนี้ คือ

2.3.1 จากตัวอย่างที่ส่งตรวจ

สำหรับการเพาะแยกไวรัสในสัตว์ อาจได้มาจากชิ้นเนื้อเยื่อขนาดเล็กของสัตว์ต่าง ๆ ขณะที่สัตว์ยังมีชีวิต เรียกว่า biopsy และเมื่อสัตว์ตายใหม่ๆ (autopsy) สิ่งคัดหลั่ง เช่น น้ำมูก น้ำลาย อุจาระ(fecal sample) เลือด (whole blood) ซีรัม (serum) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิดทุติยภูมิ

(secondary cell culture or continuous cell line) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด เซลล์นี้มีจำหน่ายทางการค้า ถือเป็นมาตรฐานที่แต่ละห้องปฏิบัติการไวรัสจะต้องมี โดยชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำเป็นต้องมีในห้องปฏิบัติการไวรัสจะมีความสัมพันธ์กับชนิดของไวรัสที่ห้องปฏิบัติการรับตรวจ

ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปฐมภูมิ เช่น เซลล์ ไตลิง ชนิด Vero cell เซลล์ จากสุนัข ชนิด Canine A-72 cells line เซลล์จากแมวชนิด CRFK เป็นต้น โดยเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากสัตว์สปีชีส์ใดก็จะมีความสัมพันธ์กับไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์สปีชีส์นั้น ๆ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เองเป็นอาหารที่มีจำหน่ายทางการค้า (commercial products) เช่นกัน มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ สารอาหาร และกรดอะมิโนที่จำเป็น องค์ประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth factors) สารป้องกันเชื้อรา และสารปฏิชีวนะ โดยทั่วไปคือ Penicillin และ Streptomycin ดังนั้น ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพชนิด แบคทีเรีย ที่มีสาเหตุจากตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจนั้น จะถูกลดโดยการใช้สารปฏิชีวนะ และวัสดุที่ใช้ในการกรองตัวอย่างที่ถูกบดย่อย ก่อนนำไปแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง



รูปที่ 16 การบดตัวอย่างจากเนื้อเยื่อสัตว์ที่ส่งตรวจเพื่อการเพาะแยกไวรัส

2.3.2 การปนเปื้อนที่เกิดจากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเพาะแยกไวรัส

การปนเปื้อนที่เกิดจากวัสดุอุปกรณ์ อาจเกิดได้จากการเตรียมอุปกรณ์ใช้งานที่เกี่ยวข้องวัสดุวิทยาศาสตร์ที่ผ่านการทำความสะอาดที่ไม่เหมาะสม หรือการที่อุปกรณ์ และวัสดุสัมผัสสิ่งปนเปื้อนก่อนถูกนำมาใช้งาน เช่นการเปิดใช้ในขณะที่ไม่ได้อยู่ตู้ปลอดเชื้อทำให้วัสดุอุปกรณ์เหล่านั้นสัมผัสเชื้อในอากาศได้

2.3.3 การปนเปื้อนที่เกิดจากผู้ปฏิบัติงาน

ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป จำเป็นต้องป้องกันการสัมผัสเชื้อจุลชีพโดยตรง นอกเหนือจากที่ห้องปฏิบัติการต้องมีอุปกรณ์ อื่น ๆ เช่นตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมอุณหภูมิ บริเวณที่ทำงานที่สะอาด ซึ่งฆ่าเชื้อด้วยรังสี อัลตร้าไวโอเล็ต (UV) หากผู้ปฏิบัติงานไม่มีสุขอนามัยที่ดี เช่นไม่มีการล้างมือ ทำความสะอาดร่างกาย ส่วนใดส่วนหนึ่งที่สัมผัสอาจนำมาสู่การปนเปื้อนเชื้อจุลชีพอื่น ๆ ที่ติดมาจากผู้ปฏิบัติงานได้

รูปที่ 17 ผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการไวรัส สวมเสื้อกาวน์ ถุงมือ หมวก หน้ากากเพื่อป้องกันการสัมผัสเชื้อ จุลชีพอื่นในระหว่างปฏิบัติงาน

2.4 รูปแบบการปนเปื้อน

สิ่งปนเปื้อน (contaminant) หมายถึง สารใด ๆ ก็ตามที่ไม่ได้ตั้งใจเติมลงไปในระหว่างการปฏิบัติงาน แต่มีการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารจากสิ่งแวดล้อม หรือจากความพลั้งเผลอ การปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ระหว่างกระบวนการทำงาน จากตัวอย่างที่ส่งมา จากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ การขนส่ง หรือภาคปฏิบัติงาน ซึ่งมีผลเสียต่อคุณภาพงาน และความปลอดภัยในการทำงาน และส่งผลต่อผลสำเร็จของงาน รูปแบบของการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการไวรัส โดยทั่วไปมีดังนี้

2.4.1 การปนเปื้อนทางกายภาพ (physical contamination)

เป็นการปนเปื้อน ด้วยสิ่งที่เป็นเศษชิ้นส่วน ทั้งที่เป็นสิ่งของและชิ้นส่วน ของ กระดูก เศษพลาสติก เศษแก้ว ที่มาจากวัสดุ อุปกรณ์ สิ่งของที่ใช้ในระหว่างปฏิบัติงาน ภาชนะเลี้ยงเซลล์ และสิ่งของที่ใช้ในการเพาะแยกไวรัส บนอุปกรณ์ พลาสติก เครื่องแก้ว ที่ใช้ในระหว่างปฏิบัติงาน และปนเปื้อนภายในภาชนะเลี้ยงเซลล์ การปนเปื้อนลักษณะนี้ไม่ค่อยเกิดขึ้น แต่ก็มีโอกาสที่พบได้

2.4.2 การปนเปื้อนทางเคมี (chemical contamination)

ซึ่งอาจนำไปสู่อันตรายทางเคมี (chemical hazard) เช่น สารสังเคราะห์เช่นยาฆ่าเชื้อโรค สารอันตรายต่าง ๆ เป็นการปนเปื้อนสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการปฏิบัติงาน นอกจากส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ และเพาะแยกไวรัสแล้วยังส่งผลต่อสุขภาพผู้ปฏิบัติงานด้วย สารเคมีที่สำคัญที่อันตรายและอาจปนเปื้อนได้ เช่น สารคลอรีน ที่ใช้ในการทำความสะอาด แอลกอฮอล์ (alcohol) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (fomaldehyde)

2.4.3 การปนเปื้อนทางจุลินทรีย์ (microbiological contamination)

หมายถึงการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และสปอร์ของแบคทีเรีย (bacterial spore) รา และสปอร์ของรา ยีสต์ รวมถึง ปรสิต (parasite) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานปฏิบัติการ ในตารางการทำงานปกติ เมื่อมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลชีพ เป็นการปนเปื้อนที่สามารถแพร่กระจายไปได้รวดเร็วเนื่องจากเชื้อจุลชีพเช่น แบคทีเรีย แบ่งตัว และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือน้ำยาเลี้ยงเซลล์ และอุณหภูมิ 37 ℃ ก็นับว่าเป็นอุณหภูมิที่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดี การปนเปื้อนที่สำคัญคือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ซึ่งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งชนิดที่ก่อโรค และไม่ก่อโรค การปนเปื้อนลักษณะนี้ส่งผลต่อ การเจริญเติบโตของเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการเพาะแยกไวรัส ทำให้เซลล์อ่อนแอ และตาย รูปแบบการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพอาจพบการปนเปื้อนได้ทั้งกับอุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ และตัวผู้ปฏิบัติงานเอง

2.5 ผลของการปนเปื้อน

ผลของการปนเปื้อนในลักษณะที่เป็นการปนเปื้อนจากรูปแบบทางกายภาพ และสารเคมีจะสามารถตรวจสอบได้ง่าย กล่าวคือสามารถมองเห็นได้ เช่นพบเศษชิ้นส่วนของกระดูกสัตว์ ในตัวอย่าง หรือ ภาชนะที่ใช้งานหรือเศษแก้ว การปนเปื้อนทางกายภาพ ทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือมีผลต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในงาน

การปนเปื้อนทางเคมี ทำให้เกิดสารพิษในร่างกาย (allergenic contamination) การปนเปื้อนสิ่งก่อภูมิแพ้ ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถเจริญได้ หรือสามารถเห็นว่าสารอาหารที่ใช้ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ มีสีเปลี่ยนไปอย่างฉับพลันเนื่องจากสภาวะความเป็นกรด และด่างส่งผลต่อสารอินดิเคเตอร์ (indicator) ที่มีในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น

ส่วนผลของการปนเปื้อนทางจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการที่สำคัญพบว่าอาจใช้เวลาตั้งแต่ 24 ชั่วโมงจนถึง 96 ชั่วโมง จึงจะสังเกตได้ถึงการเปลี่ยนแปลงของสารอินดิเคเตอร์ได้ หรือจำเป็นที่ต้องตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าหากจุลชีพที่ปนเปื้อนเป็นแบคทีเรีย รา หรือปรสิตที่มี ขนาดใหญ่สามารถตรวจสอบเบื้องต้น และสามารถถ่ายภาพได้ แต่หากเป็นการปนเปื้อนไวรัสด้วยกันแต่ไม่ใช่ชนิดที่ต้องการเพาะเลี้ยงจำเป็นที่ต้องใช้วิธีอื่น ๆที่มีความละเอียดและเฉพาะเจาะจง เช่นวิธีการทางอณูวินิจฉัย (molecular biology) การสังเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR) อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย และรามีรายงานว่าเป็นปัญหาในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา หลายแห่งด้วยกันเนื่องจากมีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อจุลชีพอื่น ๆ และมนุษย์

2.6 การจัดการป้องกันการปนเปื้อน

การป้องกันการปนเปื้อน ในการป้องกันทางกายภาพและการปนเปื้อนทางเคมี มีหลักการคือ ในการปฏิบัติงานทุกครั้งต้องตรวจสอบ พื้นที่ใช้งาน อุปกรณ์ ก่อนปฏิบัติงานทุกครั้ง และหลังปฏิบัติงานต้องมีแนวทางปฏิบัติงานที่ถูกต้อง เช่นการกำจัดขยะที่ใช้ระหว่างการทำงานเช่นเศษพลาสติก แก้วที่เกิดขึ้นขณะทำงาน โดยการทิ้งให้ถูกที่ ส่วนการป้องกันการปนเปื้อนทางเคมี จำเป็นที่ผู้ปฏิบัติต้องเพิ่มความระมัดระวังในการใช้สารเคมี ทั้งการเตรียมสาร ต้องศึกษาวิธีการ ความเข้มข้น ปริมาตรที่ต้องการใช้งานให้ถูกต้อง เมื่อใช้งานเสร็จต้องจัดเก็บในอุณหภูมิ และสถานที่ ๆ ที่ระบุไว้สำหรับสารแต่ละชนิด

สำหรับการจัดการป้องกันและลดโอกาสการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลชีพ หากเป็นแบคทีเรีย รา ห้องปฏิบัติการใช้สารเคมี จำพวกสารฆ่าเชื้อ ในการเช็ดทำความสะอาดในพื้นที่ปฏิบัติงาน สารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่คือ แอลกอฮอล์ 70 % โดยใช้ทั้งในรูปแบบที่เป็นสเปรย์พ่นบนพื้นที่ผิวซึ่งใช้ปฏิบัติงาน และสำลีแอลกอฮอล์ที่ใช้เช็ดบริเวณภายนอกภาชนะ นอกจากนี้ยังใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) เป็น

เวลาครั้งละ 15 นาที หลังจากปฏิบัติงานครั้งหนึ่งๆ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีแนวทางปฏิบัติด้านต่าง ๆ ที่มีต่อการป้องกันการปนเปื้อน รวมทั้งใช้วัสดุ และอุปกรณ์ที่สะอาดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วก็ตาม แต่โอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อน ก็ยังอาจเกิดขึ้นได้เสมอ

2.7 งานวิจัยวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กฤษณียา (2548) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียและ เชื้อราที่ก่อโรคในโรงพยาบาล โดยเปรียบเทียบการทำงานของเครื่องมือเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในอากาศจากเครื่องมือ 2 ชนิด แบบวิธี Andersen impactor และวิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความสอดคล้องกันในเรื่องของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในอากาศพบที่ในโรงพยาบาล คือ พบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เหมือนกัน ข้อดีของวิธีการวางจานอาหารเลี้ยง เชื้อ คือ ราคาถูก ประหยัด ใช้ง่ายไม่จำเป็นต้องเป็นผู้เชี่ยวชาญในการเก็บและไม่ต้องใช้อุปกรณ์อื่นช่วยในการเก็บ ใช้แต่จานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ทำให้ไม่มีเสียงดังรบกวนผู้อื่นและรบกวนการทำงานของเจ้าที่ที่ทำงานอยู่ ส่วนข้อจำกัดของวิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ต้องใช้จานเพาะเชื้อ ไม่ต่ำกว่า 3 จานในการเก็บตัวอย่าง ในการศึกษานี้ยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ที่พบในโรงพยาบาล ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดก่อโรคฉวยโอกาส คือไม่ก่อโรคในคนปกติแต่จะก่อโรคเฉพาะกับคนที่มีร่างกายอ่อนแอ มีภูมิคุ้มกันโรคต่ำเท่านั้น เชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ตามเสื้อผ้าสิ่งของเครื่องใช้ต่าง ๆ เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายจากคนบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งได้โดยการสัมผัสหรือทางอากาศ

พินิจ (2553) ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายเชื้อ P. aeruginosa ในสถานพยาบาลและความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ P. aeruginosa กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและจำนวนผู้ป่วยที่มารับบริการ โดยทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้งเป็นระยะเวลา 12 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 ซึ่งในแต่ละครั้งจะทำการเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 8 จุด ในแผนกต่าง ๆ ของโรงพยาบาลนภาลัย อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม ด้วยวิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและนำมาทดลองความสัมพันธ์และปัจจัยทางอุตุนิยมวิทยา และจำนวนผู้ป่วย พบว่าตรวจพบเชื้อ P. aeruginosa มากที่สุดในห้องขยะติดเชื้อ รองลงมาได้แก่แผนกผู้ป่วยหนัก แผนกผู้ป่วยศัลยกรรม ตึกผู้ป่วยสามัญ แผนกฉุกเฉิน และห้องตรวจโรคผู้ป่วยนอก ตามลำดับ ส่วนในห้องผ่าตัด และ แผนก-ทันตกรรม ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย P. aeruginosa ส่วนเดือนที่พบมากที่สุดได้แก่ เมษายน รองลงมาคือ มีนาคม มิถุนายน พฤษภาคม สิงหาคม กันยายน กรกฎาคม กุมภาพันธ์ มกราคม พฤศจิกายน ตุลาคม และ ธันวาคม ตามลำดับ และพบว่ามีความสัมพันธ์กับปัจจัยของสภาพแวดล้อมทางอากาศ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนผู้ป่วยโรคระบบทางเดินหายใจ

พัลลภ และคณะ (2553) ได้ทำการสำรวจหาจุลชีพในบรรยากาศห้องผ่าตัดของโรงพยาบาล ห้องเรียน ห้องประชุมของสถานศึกษา เปรียบเทียบระหว่างการใช้เครื่องดักจับเชื้อกับวิธีการวางจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่งมุมเตียง พบเชื้อราอย่างน้อย 8 ชนิด (Aspergillus spp. Mucor spp. Rhizopus spp. Penicllisum spp. Scopulariopsis spp. Non sporulating fungi และ Yeasts) และแบคทีเรีย 6 ชนิด (Staphsaprophyticus Staphepidermidis Micrococcus sp. Flavobacterium spp. และ Diphtheroid spp.) การทำความสะอาดหลังใช้งานด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อถูพื้นห้องไม่สามารถลดจำนวนเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรอบห้องและมุมเตียงลงได้ การสำรวจเชื้อในห้องประชุมภายในอาคารเรียนของสถานศึกษาพบเชื้อรา อย่างน้อย 7 ชนิด (Aspergillus niger. Aspergillus spp. Cladosporium spp. Rhizopus spp. Penicillisum spp. Fusarium spp. และเชื้อราชนิดที่ไม่สร้างสปอร์ (Non sporulating fungi) การทำความสะอาดห้องก็ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อราและแบคทีเรียลงได้เช่นกัน แต่เมื่อปรับเปลี่ยนการทำความสะอาดพื้นห้องโดยใช้น้ำยาดักฝุ่นแทนการถูด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ การสำรวจในห้องเรียนพบว่าจำนวนเชื้อ 6 ตำแหน่งรอบห้องลดลงถึง 5 เท่า

ศิริพร และ กาญจนา (2555) ทำการศึกษาเรื่องการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในบรรยากาศในโรงพยาบาลขนาดที่แตกต่างกัน เก็บตัวอย่าง 4 จุด คือ คลินิกวัณโรค หอผู้ป่วยนอก ห้องอุบัติเหตุฉุกเฉิน และห้องทำงานบริหารงานทั่วไป จากโรงพยาบาล 3 แห่งที่มีขนาดแตกต่างกัน ด้วยเครื่องมือ 2 ชนิด คือ Biosampling และ วิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเก็บจุดละ 3 ครั้ง ในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2533-เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบเชื้อจุลินทรีย์ในบรรยากาศ ในโรงพยาบาลชุมชนที่ทำการศึกษาทั้งหมด 8 ชนิด จำแนกเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม คือเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ 1 ชนิด คือ Acinetobacter spp. และเชื้อไม่ก่อโรค 7 ชนิด ได้แก่ Aspergillus spp. Staphylococcus spp. Diphtheroid spp. Micrococcus spp. Streptococcus spp. Bacillus และ Fusarium spp. เชื้อราเป็นเชื้อที่พบได้ตามธรรมชาติและเป็นเชื้อฉวยโอกาสซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดโรคในคนปกติแต่จะก่อโรคเฉพาะคนที่มีร่างกายอ่อนแอ มีภูมิคุ้มกันโรคต่ำเท่านั้น ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เฉลี่ยสูงที่สุดพบในโรงพยาบาลชุมชนขนาด 120 เตียง พบ 456.11 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร และ 392.97 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุดเหมือนกันทั้ง 3 โรงพยาบาล คือ Bacillus spp. ในโรงพยาบาลชุมชนขนาด 30 เตียง รองลงมาคือโรงพยาบาลชุมชนขนาด 90 เตียงและโรงพยาบาลชุมชนขนาด 120 เตียง โดยพบร้อยละ 24.64 42.60 และ 43.61 ตามลำดับ เชื้อราที่พบมากที่สุดเหมือนกันทั้ง 3 โรงพยาบาลคือ Aspergillus spp. โดยพบมากในโรงพยาบาลชุมชนขนาด 30 เตียง รองลงมาคือ โรงพยาบาลชุมชนขนาด 90 เตียงและโรงพยาบาลชุมชนขนาด 120 เตียง (พบร้อยละ 62.66 28.18 และ 21.07 ตามลำดับ) จุดที่พบจุลินทรีย์มากที่สุดในโรงพยาบาลชุมชนขนาด 90 เตียง และ 120 เตียง คือหอผู้ป่วยนอก ส่วนโรงพยาบาลชุมชนขนาด 30 เตียง พบเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด ที่คลินิกวัณโรค จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าในจุดที่เก็บตัวอย่างจะพบเชื้อรา Aspergillus spp. เป็นเชื้อฉวยโอกาสซึ่งจะก่อโอกาสเฉพาะกับคนที่มีร่างกายอ่อนแอได้

ภาคภูมิ (2559) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ Bacillus cereus ในอาหาร การนำเอาเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารมากมาย เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์และเพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบเมื่อเปรียบกับวิธีดั้งเดิม Bacillus cereus เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของโรคอาหารเป็นพิษ ในการศึกษานี้ทำการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ Bacillus cereus ที่มีความไวและจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อก่อโรคนี้ ซึ่งไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนก่อโรค nheA ถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้โดยความเข้มข้นต่ำสุดของไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์ยีน nhea ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เท่ากับ 0.4 ไมโครโมลาร์ สำหรับอุณภูมิของ annealing ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ยีน nheA ของ Bacillus cereus ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เท่ากับ 50 องศาเซลเซียสโดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไพรเมอร์ดังกล่าวมีขนาดเท่ากับ 500 bp เมื่อทำการทดสอบความไวของเทคนิคพีซีอาร์ ต่อการตรวจวิเคราะห์ยีน nheA ของ Bacillus cereus ในตัวอย่างอาหาร พบว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจพบเท่ากับ 35 CFU/g สำหรับการทดสอบความไวของเทคนิคพีซีอาร์ต่อการตรวจวิเคราะห์ยีน nheA ของ Bacillus cereus พบว่าปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ ตรวจพบ เท่ากับ 7.5 × 102 CFU/ml สำหรับการตรวจวิเคราะห์ Bacillus cereus ในตัวอย่างอาหารด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามี ตัวอย่างอาหาร จำนวน 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่มีการตรวจพบ Bacillus cereus ซึ่งมีค่า เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (8/10) และพบ Bacillus cereus เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (5/10) โดยการตรวจวิเคราะห์แบบดั้งเดิม ในการ ทดสอบความจำเพาะของไพร์เมอร์ของยีน nheA ต่อ Bacillus cereus พบว่าไพร์เมอร์มีความจำเพาะต่อ Bacillus cereus ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการศึกษาครั้งนี้ ให้ผลในการตรวจวิเคราะห์ แบคทีเรียก่อโรคในตัวอย่างอาหารได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบ Bacillus cereus ในตัวอย่าง อาหารประเภทอื่น ๆ ได้

สุดสายชล (2554) การตรวจหาปริมาณเชื้อ Bacillus cereus ในน้ำพริก โดยใช้น้ำพริก 4 ชนิดในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำพริกปลาย่าง น้ำพริกปลาร้า น้ำพริกปลาทู และน้ำพริกกะปิ โดยแต่ละชนิดจะมี 5 ร้านค้า รวมทั้งหมด 60 ตัวอย่าง โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำพริกจากร้านขายน้ำพริกที่บริเวณตลาดไนท์บาซาร์กำแพงเพชร และบริเวณตลาด ศูนย์การค้า ในอำเภอเมืองกำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร มาทำการตรวจนับจำนวนเชื้อ Bacillus cereus ตามวิธีการของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online ระหว่างเดือนกันยายน 2558 ถึงเดือนธันวาคม 2558 พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ Bacillus cereus ในน้ำพริกปลาย่างมากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยมากถึง 4.29 x 103 เซลล์ต่อกรัม ในขณะที่ น้ำพริกปลาทูมีการปนเปื้อนเชื้อ Bacillus cereus ต่ำที่สุด โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อเท่ากับ 1.50 x 102 เซลล์ต่อกรัม และร้านจำหน่ายน้ำพริกที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุขคือร้านที่ 2 สามารถตรวจพบปริมาณ เชื้อ Bacillus cereus เฉลี่ยได้ไม่เกินเกณฑ์ที่ประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้

อาลักษณ์ (2561) ได้ทำการศึกษาปัจจัยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นและความเข้มข้นของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ Bacillus cereus ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการคัดเลือกชนิดเหลว สารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ceftriaxone, polymyxin B sulfate, trimethoprim, novobiocin, และ amoxicillin ที่ระดับความเข้มข้นเท่าที่ใช้ตามมาตรฐาน (10 mg/L) ครึ่งหนึ่งของมาตรฐาน (5mg/L) และสูงกว่ามาตรฐานหนึ่งเท่า (20 mg/L) ความเข้มข้นของเชื้อ Bacillus cereus ได้ทำการศึกษาในอาหารเหลวชนิด Tryptic Soy Broth (TSB) และทำการนับจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Tryptic Soy Agar (TSA) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า ceftriaxone, polymyxin B sulfate, และ trimethoprim เป็นสารยับยั้งที่ให้ผลดีที่สุดซึ่งไม่ส่งผลต่อการเจริญของ Bacillus cereus อย่างไรก็ตาม trimethoprim ไม่ส่งผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ Escherichia coli และ Staphylococcus aureus เช่นกัน สำหรับ novobiocin และ amoxicillin ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง Bacillus cereus

Tighe and Warder (1995) ได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาล พบว่าในห้องผ่าตัดมีการปนเปื้อนเชื้อราซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ Penicillin ssp. Aspergillus spp. และ Cladosporium spp. จำนวน 54 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร และพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ Staphylococcus spp. และ Micrococcus ssp. จำนวน 74 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร และยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีกเช่น Pseudomonas spp. Streptococcus spp. และ Bacillus spp. เป็นต้นในห้อง ICU และ CCU ในห้องตรวจโรคพบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียชนิดเดียวกับห้องผ่าตัด โดยพบเชื้อราจำนวน 23 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร แบคทีเรียจำนวน 83 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร พบเชื้อราจำนวน 23 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร พบเชื้อราจำนวน 23 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร แบคทีเรียจำนวน 52 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ ส่วนห้องพักผู้ป่วยพบเชื้อรา 43 โคโลนีติอลูกบาศก์เมตร และในส่วนทางเดินระหว่างตึกของโรงพยาบาล พบเชื้อราจำนวน 84 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร แบคทีเรียจำนวน 207 โคโลนีต่อลูกบาศก์เมตร

Nandanlal et al., (2007) ทำการศึกษาถึงการแพร่กระจายของเชื้อ Bacillus cereus และเชื้อ Bacillus cereus จากอากาศภายในอาคารของโรงพยาบาลในเมือง ประเทศอินเดีย โดยทำการเก็บตัวอย่าง 8 ครั้ง ตั้งแต่เดือนกันยายน ค.ศ.1997 ถึง เดือนมิถุนายน ค.ศ.1999 ผลการศึกษาตรวจพบเชื้อมาจากทางเดินหายใจและลำคอของผู้ป่วยที่ไอ จามที่อยู่ตามบริเวณต่าง ๆ เช่น เตียง พื้น และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในโรงพยาบาล มีอนุภาคที่ฟุ้งกระจ่ายนี้เป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล และจำนวนผู้ป่วยมีผลโดยตรงต่อประมาณเชื้อที่ตรวจพบจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนผู้ป่วยในโรงพยาบาล

Aaebtu, (2005) ได้วิจัยเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพจากถุงมือที่ใช้ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติงานและแพร่ไปยังสิ่งแวดล้อม โดยการปนเปื้อนนั้นเป็นที่น่ากังวลว่าจะนำไปสู่การปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพอื่นที่เป็นอันตรายและก่อให้เกิดโรคมีความสำคัญต่อคน ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษาในกลุ่มเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการตรวจเชื้อจุลชีพ โดยแบ่งเป็นกลุ่มทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเจ้าหน้าที่ที่มักจะใส่ถุงมือในการทำงานเสมอ ๆ และใช้ถุงมือในขณะที่ทำงานเพาะแยกเชื้อจุลชีพแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 2 เป็นเจ้าหน้าที่ที่ ไม่สวมถุงมือขณะทำงานเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย นักวิจัยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน คือ เก็บเชื้อแบคทีเรียก่อนและหลังจากเจ้าหน้าที่เหล่านั้นทำงานและยังเก็บตัวอย่างจากบริเวณพื้นที่อื่น ๆ ที่เจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานเสมอ ๆ เป็นบริเวณที่มีการสัมผัสอยู่เสมอ ตลอดช่วงระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในการวิจัยครั้งนี้มีการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนเฉพาะชนิด Staphylococcus aureus โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่เป็นสิ่งคัดเลือกเชื้อ Staphylococcus aureus ได้ เนื่องจากมันจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเมื่อมี Staphylococcus aureus อยู่ อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ดื้อยาเมทิลซิลลิน (MRSA) ,มีเชื้ออื่น ๆ เช่น Pseudomonas aeruginosa , Salmonella spp. และเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรีย ที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหารหรือท้องเสีย ผลการวิจัยพบว่า กลุ่มเจ้าหน้าที่ที่ไม่สวมถุงมือขณะปฏิบัติงานมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือได้รับเชื้อ Staphylococcus aureus (ซึ่งเป็นกลุ่มดื้อยาเมทิลซิลลิน) สูงกว่ากลุ่มที่สวมถุงมือทำงานแต่การใส่ถุงมือไม่สามารถป้องกันเชื้อเอ็นเทอโรแบคทีเรียได้ การล้างมือบ่อย ๆ การศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การใช้ถุงมือสามารถปกป้องผู้ปฏิบัติงานจากเชื้อ Staphylococcus aureus สายพันธุ์ดื้อยาเมทิลซิลลินได้และพบว่าเชื้อตัวนี้พบได้มากที่สุดจากห้องปฏิบัติการ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อน *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มบนพื้นที่ผิวบริเวณพื้นที่ปฏิบัติงาน วัสดุ อุปกรณ์ และบนมือของผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งจัดเก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำส่งตัวอย่างเพื่อทำการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย (bacteria culture) และบันทึกผลการเพาะแยกเชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม โดยวิธีการและขั้นตอนสรุปรายละเอียดดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

3.1.1 วัสดุป้องกันส่วนบุคคล ได้แก่ ถุงมือยาง หน้ากากอนามัย

3.1.2 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเชื้อ ได้แก่ ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (culture flask) หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 15 ml, 50 ml

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

(1) ตู้บ่มเชื้อและเลี้ยงเซลล์ชนิดควบคุมอุณหภูมิ (37 องศาเซลเซียส) รุ่น IF160 Memmert®

(2) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ความดัน รุ่น LAC-5060S LABTECH®

(3) เครื่องอุ่นสารละลาย (water bath) รุ่น WNB29 with Slope Cover Memmert®

(4) เครื่องกวนสารละลาย (stirrer) รุ่น SP131630-33Q ยี่ห้อ BARNSTEAD®

(5) เครื่องชั่งสาร (weighing scale) รุ่น BSA2245 CW ยี่ห้อ SARTORIUS®

(6) จานอาหาร (petri dish)

(7) หลอดแก้วสำหรับใส่สารเพื่อวิเคราะห์ทางชีวเคมี

(8) ชุดอุปกรณ์เพาะเชื้อแบคทีเรียซึ่งประกอบไปด้วย ก้านเขี่ยเชื้อ (loop) แป้น และตะเกียง

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

(1) อาหารวุ้นชนิดผงสำเร็จรูป สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดเติมเลือด blood agar

(2) แอลกอฮอล์เพื่อใช้ในการเช็ดทำความสะอาดพื้นที่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

(3) น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ในการเตรียมอาหาร

(4) อาหารเหลวชนิด Maximum Recovery Diluent (MRD broth)

3.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้ง *Bacillus cereus*.เจริญได้ดีบนอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วน ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) ซึ่งจะมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ได้จะทำให้เกิดเป็นบริวณใส ๆ (clear zone) บริเวณรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย เป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทำในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปชนิด Nutrient agar (brain heart infusion®) และ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด Blood agar

1.ชั่ง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) 30 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจนละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °Cนาน 15 นาที

3.เตรียมจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร โดยอบที่อุณหภูมิ 180 ℃ นาน 2 ชั่วโมง

4.เตรียมเลือดโค/หรือเลือดแกะ 7%

5.เทอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทใส่จานเพาะเชื้อหนา 15 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

6.นำจานเพาะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเรียบร้อยแล้วบรรจุลงในถุงสะอาด เพื่อนำไปเก็บตัวอย่างต่อไป (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ,2555)

3.2.2 วิธีการเตรียมอาหารเหลว Maximum Recovery Diluent (MRD broth)

สำหรับวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่องเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ให้ค่าเป็นหน่วยแมคฟาร์แลนด์ (Mcfarland unit)

1.Sodium chloride 8.5 กรัม

2.น้ำกลั่น 1000 มิลลิตร

3.ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °Cนาน 15 นาที (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2555)

3.3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

แม้ว่าวัสดุได้ผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อและอบแห้งมาแล้วก็ตาม แต่วัสดุเหล่านั้นอาจสัมผัสกับพื้นที่ผิวของห้องปฏิบัติการบางส่วนที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย โดยบริเวณพื้นที่ผิวนั้นอาจได้รับการทำความสะอาดไม่ดีพอ โดยน้ำยาทำความสะอาดไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด และนอกจากนี้พื้นที่ผิวภายนอกเช่นบริเวณที่วางวัสดุ อุปกรณ์ ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง อัลตราไวโอเลต (UV) ทำให้บริเวณนั้นมีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนได้ และอาจเกิดจากการปนเปื้อนจากตัวผู้ปฏิบัติงานซึ่งทำความสะอาดมือ และร่างกายมาไม่ดีพอและอาจนำไปสู่การปนเปื้อนของวัสดุวิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์อื่น ๆ ที่บุคคลนั้นสัมผัส ระหว่างการปฏิบัติงาน ส่วนช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจการปนเปื้อน *Bacillus cereus* คือช่วงเวลาเช้า (7.30 น.) และ หลังเลิกงาน ตอนเย็น (16.30 น.) ความถี่ในการเก็บตัวอย่างทั้งหมดจุดละ 3 ซ้ำ ระยะเวลา 3 เดือน ดังรายละเอียดดัง (9.1)

3.3.1 การเก็บและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไวรัส ศึกษาข้อมูลห้องปฏิบัติการจากเว็บไซต์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และขอความอนุเคราะห์จากผู้ดูแลรับผิดชอบห้องปฏิบัติการไวรัส เพื่อเข้ามาสำรวจพื้นที่และห้องปฏิบัติการ รวมถึงองค์ประกอบที่เกี่ยวข้อง สำหรับการใช้งานห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จำนวนห้องปฏิบัติการ ประเภท อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับปฏิบัติการ ลักษณะ ตำแหน่งของพื้นที่ปฏิบัติการ บุคลากร และผู้ปฏิบัติงาน โดยผลการสำรวจและข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ถูกนำมาใช้พิจารณาเลือกและกำหนดจำนวนห้องปฏิบัติการภายใน หรือพื้นที่ปฏิบัติงานและเครื่องมืออุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบการปนเปื้อนก่อนและหลังการปฏิบัติงาน โดยบุคลากรและผู้ปฏิบัติงานของห้องหรือพื้นที่ที่เลือกศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดเลือกเก็บตัวอย่างปนเปื้อนบนพื้นที่ผิวสัมผัสที่เกี่ยวข้องของ 4 ห้อง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการ 1 ห้องปฏิบัติการ 2 ห้องปฏิบัติการ 3 ห้องชั่งสารและทำความสะอาด เนื่องจากพบว่ามีความถี่ของการใช้งานร่วมกันระหว่างผู้ปฏิบัติงานมากที่สุด โดยมีสมมติฐานที่เกี่ยวข้องว่าพื้นที่ผิวสัมผัสบนอุปกรณ์ที่ใช้งาน และจุดที่ผู้ปฏิบัติงานประจำใช้งานบ่อยๆ รวมทั้งพื้นที่ผิวสัมผัสบนมือของตัวผู้ปฏิบัติงานเอง น่าจะมีโอกาสสูงของการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพได้ง่าย โดยพบว่าวัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ที่ใช้งานโดยผู้ปฏิบัติงานร่วมกันบ่อยครั้งจึงมีความเสี่ยงในการปนเปื้อน

เชื้อสูงด้วยเช่นกัน ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้เก็บความเย็น บริเวณโต๊ะทำงาน ก๊อกน้ำ และที่จับประตู ทั้งนี้ ยังมีพื้นที่ผิวสัมผัสบนวัสดุ และอุปกรณ์บางประเภทที่อาจจะมีการปนเปื้อนเชื้อ เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องชั่งสาร (weighing scale) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) และจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจเพื่อวินิจฉัย (ไม่สามรถระบุได้ขึ้นอยู่กับการปฏิบัติงานของแต่ละวัน)

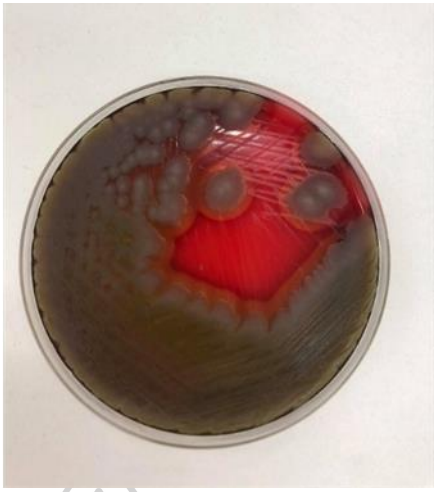
3.3.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อ *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีแบบสุ่ม บนพื้นที่ผิวบริเวณที่ปฏิบัติงาน วัสดุ อุปกรณ์ และบนมือของผู้ปฏิบัติงาน โดยพื้นที่ผิวหรือบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างของห้องปฏิบัติการไวรัสมีจำนวน 12 จุด ประกอบด้วยการเก็บตัวอย่างจากผู้ปฏิบัติงานประจำ จำนวน 5 คน โดยผู้ปฏิบัติงานทุกคน เป็นผู้ปฏิบัติงานประจำของห้องปฏิบัติการไวรัสในการเลี้ยงเซลล์และเพาะแยกไวรัส ซึ่งผู้ปฏิบัติงานทั้ง 5 คน มีการใช้ห้องปฏิบัติการทั้ง 3 ห้อง ทำการเก็บตัวอย่างจากการสุ่มบริเวณมือ และพื้นที่อีก 7 จุดประกอบด้วยบริเวณที่จับประตู 1 จุด กล้องจุลทรรศน์ 1 จุด โต๊ะทำงาน 3 จุด ก๊อกน้ำ 1 จุด และตู้เย็น 1 จุด จดบันทึกวัน เวลาที่เก็บตัวอย่าง และทำการเก็บตัวอย่างการปนเปื้อนแบคทีเรียทั่วไปจากจุดที่กำหนดจากบริเวณต่าง ๆของห้องปฏิบัติการไวรัสที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 3 ห้อง ผ่านวิธีการป้ายกวาด (Swab method)

ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ sterilization (Adebotu, 2005) แล้วนำมาจุ่มในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บิดไม้พันสำลีหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง นำมาป้ายกับพื้นที่ผิวสัมผัสแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง คือ มือของผู้ปฏิบัติงาน วัสดุอุปกรณ์ และพื้นผิวปฏิบัติงาน ในห้องปฏิบัติการไวรัส (ตารางที่ 3) นำไปป้าย (Streak Plate) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) แล้วบ่มเพาะที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37 Cเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโต

ตารางที่ 3 พื้นที่และจำนวนในการเก็บตัวอย่าง

ลำดับที่	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนครั้งในการเก็บตัวอย่าง	
		ก่อนปฏิบัติงาน (ก่อน 8.30 น)	หลังปฏิบัติงาน (หลัง 16.30 น)
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	1	1
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	1	1
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	1	1
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	1	1
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	1	1
6	ที่จับประตู	1	1
7	กล้องจุลทรรศน์ 3	1	1
8	โต๊ะปฏิบัติงาน 1	1	1
9	โต๊ะปฏิบัติงาน 2	1	1
10	โต๊ะปฏิบัติงาน 3	1	1
11	ก๊อกน้ำ	1	1
12	ตู้เย็น 4°C	1	1

3.3.3 การเพาะเชื้อ Bacillus cereus จากการเก็บตัวอย่างข้อ (3.3.2) ด้วยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ (Aseptic technique) กล่าวคือมีการเผา loop ด้วยเปลวไฟ เมื่อ loop เย็นนำไปป้ายตัวอย่างที่เก็บมา และไปป้ายเขี่ย (streak plate) ใน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) แล้วบ่มเพาะที่ตู้ incubator อุณหภูมิ 37 °Cเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโต ผ่านไป 24 ชั่วโมงไม่มีการเจริญเติบโตบ่มต่อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Adebotu, 2005) สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และลักษณะโคโลนีของเชื้อ โดยผลบวก หรือตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* ในกรณีตัวอย่างควบคุมผลบวก (lab positive control) มีการเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) โดยมีลักษณะแผ่ หรือกระจายโคโลนีเป็นสีเทา (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ผลการเจริญของ Bacillus cereus ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar

ที่มา: ห้องปฏิบัติจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.4 การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย (Gram stain) การย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย เป็นวิธีการจำเพาะที่ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียจากลักษณะของการติดสีของเซลล์ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือแกรมบวก (gram- positive) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผนังเซลล์ติด สีม่วง - น้ำเงิน จากสีย้อมคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ที่มีความเข้มข้น 2-5 % และแบคทีเรียแกรมลบ (gram- negative) ซึ่งเซลล์ติดสีชมพู -แดง จากสีย้อมซาฟรานิน ออกซอยด์ (Safranin Oxoid) (Becerra et al.,2016) โดยการย้อมสีแกรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีกระบวนการย้อมดังนี้

1.นำแผ่นกระจกสไลด์ (Glass slide) ที่ผ่านการเช็คทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95% (Ethanol) แล้ว มาผ่านเปลวไฟจากตะเกียงอย่างรวดเร็ว จากนั้นหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ แล้วใช้ loop แตะเชื้อที่เจริญในจานอาหาร นำมาป้ายบนหยดน้ำที่อยู่บนสไลด์ ใช้ปลายทิป (tip) หรือไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากวนให้เชื้อแผ่ไปในหยดน้ำกลั่น กระจายเป็นวง และทิ้งตัวอย่างให้แห้งในอากาศ (air drying)

2.ตรึงตัวอย่างเชื้อให้แห้งและเกาะบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ 10 วินาที

3.หยดสีย้อม คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ให้ท่วมตัวอย่าง ทิ้งไว้ 1 นาที

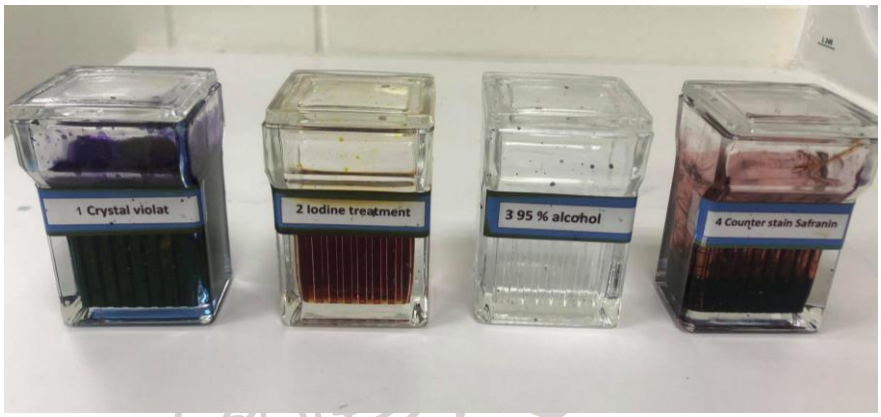
4.ล้างสีคริสตัลไวโอเล็ตส่วนเกินด้วยน้ำประปา

5.หยดสารละลาย ไอโอดีน หรือ Gram’s Iodine ให้ท่วมตัวอย่าง 1 นาที

6.หยดแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 30 วินาที ครบเวลารินสารออก ซับด้วยกระดาษทิชชูย้อมเพื่อให้เกิดความแตก

7. ต่างด้วยสีย้อม ซาฟรานิน ออกซอยด์ (Safranin Oxoid) เป็นเวลา 30 วินาที

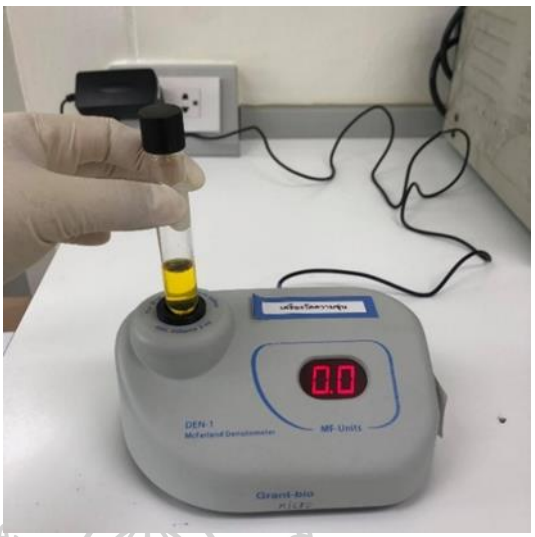
8.ครบเวลาล้างสีส่วนเกินด้วยแอลกอฮอล์ 100 % เพียง10-15 วินาที แล้ว ซับให้แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลที่ได้จะพบว่า แบคทีเรียชนิดแกรมบวก (gram-positive) ติดสีม่วง (purple) ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ (gram- negative) จะติดสีชมพู (pink)



รูปที่ 19 ชุดสีย้อมแกรม

3.3.5 การจำแนกเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธีทางชีวเคมี จากการเพาะเชื้อข้อ (3.3.3) เมื่อพบว่ามีโคโลนีที่แยกเดี่ยวเกิดขึ้น จากนั้นทำการเขี่ยโคโลนีเพื่อนำไปทดสอบหาค่าทางชีวเคมี (biochemical activity test) โดยอ้างอิงการทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้จำแนก *Bacillus cereus* ออกจาก *Bacillus spp.* ตามตารางที่ 1 ซึ่งมีการทดสอบย่อยดังนี้คือ Motility test , urease test , citrate test , starch hydrolysis test ,Gelatinase test , Nitrate Reduction test และการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 65 °C: ซึ่งใช้ nitrate broth และ phenol red glucose broth) จากนั้นทำการอ่านผลและยืนยันการตรวจพบเชื้อ *Bacillus cereus* ในตัวอย่าง 3 แหล่ง คือ 1.มือผู้ปฏิบัติงาน 2.วัสดุอุปกรณ์ และ3.พื้นที่ปฏิบัติงานแต่ละจุด เพื่อคัดเลือกตัวอย่างที่พบเชื้อ *Bacillus cereus* มาทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.6. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธีวัดแมคฟาร์แลน (McFarland)



รูปที่ 20 เครื่องวัดแมคฟาร์แลน (McFarland)

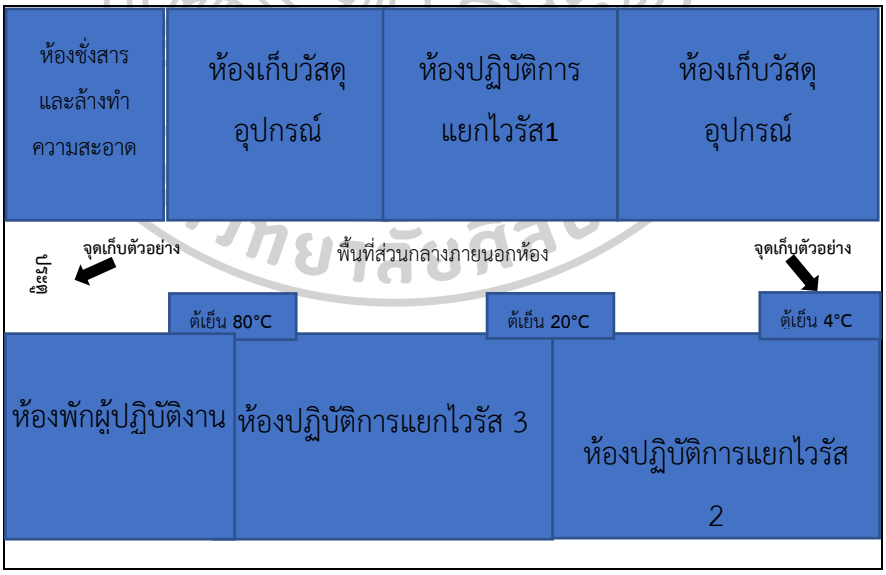
จากการจำแนกเชื้อ *Bacillus cereus* (ข้อ 3.3.5) เมื่อพบว่ามีเชื้อ *Bacillus cereus* นำเอาโคโลนี (ข้อ 3.3.3) มาเขี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) ชนิด MRD (Maximum Recovery Diluent (MRD) (ISO 6887) (Dehydrated Culture Media) ปริมาตร 3 ml บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °Cเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเข้าเครื่องวัดแมคฟาร์แลนดูความขุ่น และบันทึกข้อมูล ผลที่ได้อ่านเป็นค่าอ้างอิงที่เป็นหน่วยแมคฟาร์แลน (McFarland) โดยที่ 0.5 แมคฟาร์แลน (McFarland) จะมีเชื้อแบคทีเรีย 1 x 10^8 cfu/ml และจำแนกเชื้อตามข้อมูลอ้างอิงลักษณะ คู่มือการปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขของเชื้อ *Bacillus cereus*

3.3.7 นำผลวิเคราะห์เสนอต่อผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องเพื่อประชุมหาแนวทางแก้ไข นำผลศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* จากทั้ง 1.มือของผู้ปฏิบัติงาน 2.วัสดุอุปกรณ์ และ3.พื้นที่ปฏิบัติงาน โดยนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เสนอต่อผู้ดูแลรับผิดชอบห้องปฏิบัติการ หัวหน้านักวิทยาศาสตร์และผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องของห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผู้ที่เกี่ยวข้องดังกล่าวได้รับทราบข้อมูล และให้ร่วมแสดงความคิดเห็น แลกเปลี่ยนความคิดเห็นที่มีต่อผลการศึกษาในจุดที่มีการปนเปื้อน เพื่อหาแนวทางลดป้องกันการปนเปื้อนเชื้อในห้องปฏิบัติการ รวมถึงการมีระบบติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เกิดประสิทธิผล

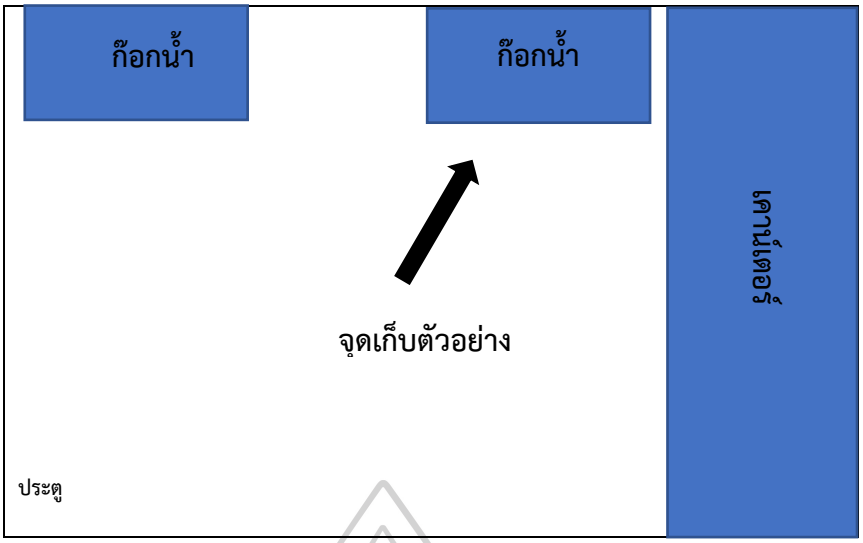
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการรวบรวมข้อมูลพื้นฐานของห้องปฏิบัติการไวรัส

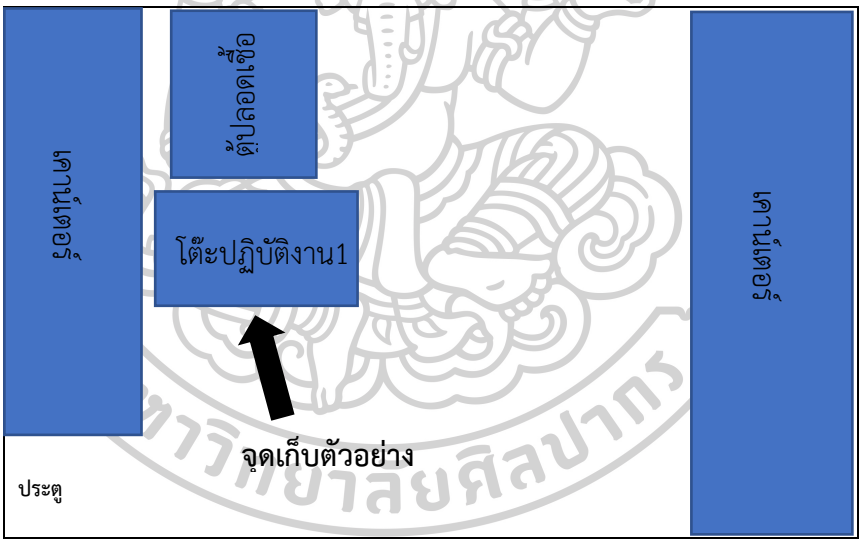
จากการรวบรวมข้อมูลและสำรวจห้องปฏิบัติการไวรัส พบว่าห้องปฏิบัติการไวรัสตั้งอยู่ที่ชั้น 2 อาคารพรีคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีการจัดผังพื้นที่ใช้งานประกอบด้วยห้อง ทั้งหมด 7 ห้อง ได้แก่ ห้องชั่งสารและล้างทำความสะอาด 1 ห้อง (รูปที่ 22) ห้องปฏิบัติการแยกไวรัสทั้งหมดจำนวน 3 ห้อง ห้องพักผู้ปฏิบัติงานจำนวน 1 ห้อง และห้องเก็บวัสดุอุปกรณ์จำนวน 2 ห้อง (รูปที่ 21) โดยมีผู้ปฏิบัติงานจำนวน 7 คน ประกอบด้วยนักวิทยาศาสตร์ 6 คน และเจ้าหน้าที่ล้างอุปกรณ์เครื่องแก้ว โดยภายในห้องปฏิบัติการแยกไวรัสทั้ง 3 ห้อง มีการติดตั้งโต๊ะปฏิบัติงานจำนวน 1 ตัว ต่อห้อง และเก้าอี้ 2 ตัว ต่อห้อง มีตู้ปลอดเชื้อ จำนวน 1 ตู้ ต่อห้อง และตู้เก็บวัสดุอุปกรณ์ ใช้สอย จำนวน 1 ตู้ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 1 ตัว ในห้องปฏิบัติการ 3 และพื้นที่ส่วนกลางภายนอกห้องทั้ง 7 นั้น มีตู้ควบคุมอุณภูมิ 4, -20, -80 องศาเซลเซียส ซึ่งผู้ปฏิบัติงานมีการใช้งานร่วมกัน (รูปที่ 21)



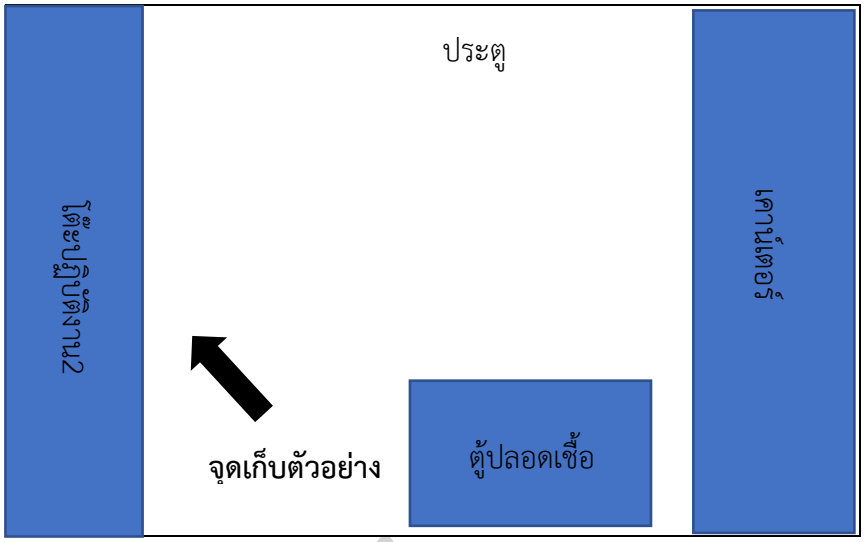
รูปที่ 21 แผนผังแสดงตำแหน่งที่ตั้งของห้องต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการไวรัส



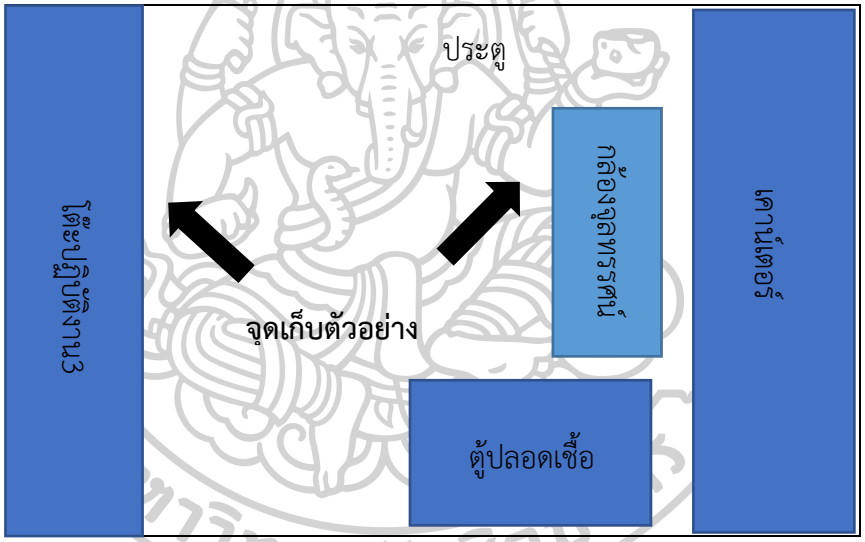
รูปที่ 22 จุดเก็บตัวอย่างในห้องชั่งสารและล้างทำความสะอาด



รูปที่ 23 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส1



รูปที่ 24 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส2

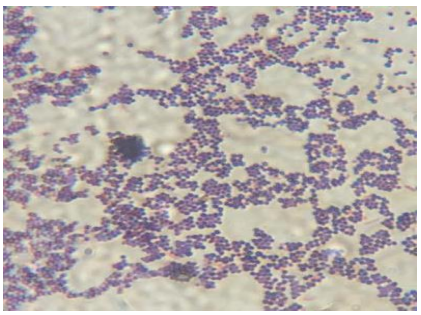


รูปที่ 25 จุดเก็บตัวอย่างในห้องปฏิบัติการแยกไวรัส 3

4.2 ผลของการสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อ *Bacillus cereus* ในห้องปฏิบัติการไวรัส

การเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus* ที่ได้จากพื้นที่ปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีพื้นที่ตรวจ จากผู้ปฏิบัติงาน จำนวน 5 คน และพื้นที่ปฏิบัติงาน 7 จุด รวมเป็น 12 จุด ทำซ้ำ 4 ครั้ง ต่อเดือน และทำการสุ่มเก็บตลอดระยะเวลา 3 เดือน รวมเป็นการเป็นเก็บตัวอย่างตลอดการทดสอบจำนวน 12 ครั้งรวม 144 ตัวอย่าง พื้นที่การสุ่มตรวจ และบุคคล แสดงในตารางที่ 4.1-4.3 เป็นพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ *Bacillus cereus* เนื่องจากสาเหตุ *Bacillus cereus* มักพบในอาหารดิบ (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุและคณะ 2558) อาหารแห้ง หรืออาหารสำเร็จรูป เช่น ธัญพืช เครื่องเทศ และอาหารแห้งชนิดอื่น อาหารประเภทเนื้อและสัตว์ปีก เช่น ไก่งวง เนื้อวัว รวมทั้งอาหารทะเล สลัด มันฝรั่ง ที่ไม่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แต่มีการพบเชื้อ *Staphylococcus spp.* โดยมีลักษณะโคโลนีคล้ายไข่ปลามีสีขาวขุ่นที่บ่งชี้เป็นเชื้อ *Staphylococcus spp.*ถูกตรวจพบแต่ไม่ได้วัดปริมาณโดยวิธี Total plate count เพียงแต่ตรวจนับความถี่ของตัวอย่างที่ปนเปื้อนในช่วงเวลาที่ศึกษา.(รูป 4.7)

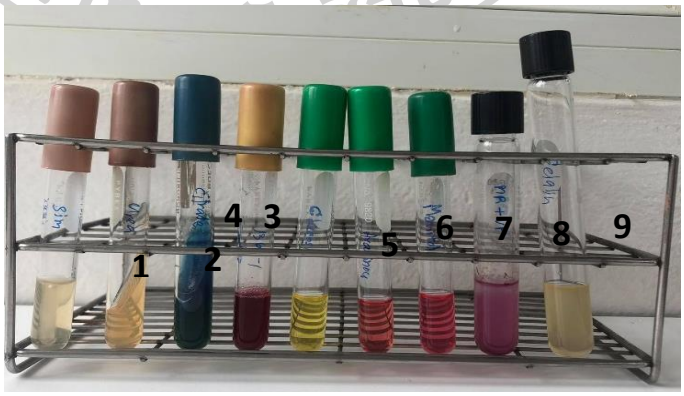
รูปที่ 26 ผลการเจริญของ Staphylococcus spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar



รูปที่ 27 ลักษณะของเชื้อ Staphylococcus spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

4.3 การปนเปือนเชื้อ *Bacillus cereus* โดยจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมี

จากการทดสอบตามกระบวนการจำแนกเชื้อจุลชีพที่ปนเปื้อนจากบริเวณพื้นที่ผิวตลอดจน วัสดุ อุปกรณ์ ที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 4.1-4.3) พบว่าการตรวจสอบโดยวิธีการตรวจเพาะแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรีย (bacterial culture) โดยใช้อาหาร ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเติมเลือด (Blood agar) และ MaCconkey ไม่พบผลบวกต่อเชื้อ *Bacillus cereus* จากตัวอย่างใด ๆ ที่สุ่มตรวจเก็บตามช่วงเวลา บริเวณพื้นที่ ๆ ที่กำหนดไว้ และจากบุคคลผู้ปฏิบัติงานประจำในห้องปฏิบัติการไวรัส ดังนั้นจึงไม่จำเป็นที่ต้องตรวจทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสปีชี่ส์ของกลุ่มเชื้อ *Bacillus spp*. และ แบคทีเรียอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างควบคุมผลบวก (lab positive control sample) เมื่อผ่านกระบวนการทดสอบทางชีวเคมีแล้วมีลักษณะการเปลี่ยนสีของสารอาหารต่าง ๆ ดังแสดง ในรูปที่ 28



รูปที่ 28 การทดสอบทางชีวเคมีของตัวอย่างควบคุมผลบวกของเชื้อ Bacillus cereus

การเก็บตัวอย่างก่อนและหลังปฏิบัติงานบนพื้นที่ปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการศึกษาเดือนธันวาคม พ.ศ.2562 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ภายในห้องปฏิบัติการแต่พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp*. ก่อนปฏิบัติงานจำนวน 12 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) และหลังปฏิบัติงานจำนวน 19 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 48 ตัวอย่าง ซึ่งการปนเปื้อนตามจุดต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการมาจากการสัมผัสโดยผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ได้ทำความสะอาดมือก่อนเข้าห้องปฏิบัติการจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp*.

ตารางที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างก่อนปฏิบัติงานและหลังปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส เดือนธันวาคม

ลำดับ	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน	ก่อนการปฏิบัติงาน (จำนวน)			หลังการปฏิบัติงาน (จำนวน)		
			B. cereus	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ	*B. cereus*	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	4	-	1	8.33	-	2	8.33
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	4	-	1	8.33	-	2	8.33
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	4	-	1	8.33	-	2	8.33
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	4	-	-	8.33	-	2	16.66
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	4	-	-	-	-	2	16.66
6	ที่จับประตู	4	-	2	16.66	-	1	8.33
7	กล้องจุลทรรศน์	4	-	1	8.33	-	2	16.66
8	โต๊ะปฏิบัติงาน 1	4	-	1	8.33	-	1	8.33
9	โต๊ะปฏิบัติงาน 2	4	-	1	8.33	-	1	8.33
10	โต๊ะปฏิบัติงาน 3	4	-	1	8.33	-	2	16.66
11	ก๊อกน้ำ	4	-	2	16.66	-	1	8.33
12	ตู้เย็น 4°C	4	-	1	8.33	-	1	8.33
รวม		48	0	12	25.00	0	19	39.58

การเก็บตัวอย่างก่อนและหลังปฏิบัติงานบนพื้นที่ปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการศึกษาเดือน มกราคม พ.ศ.2563 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ภายในห้องปฏิบัติการแต่พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp*. ก่อนปฏิบัติงานจำนวน 5 ตัวอย่าง และหลังปฏิบัติงานจำนวน 21 ตัวอย่าง (ตารางที่ 5) จากตัวอย่างทั้งหมด 48 ตัวอย่าง ซึ่งการปนเปื้อนตามจุดต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการมาจากการสัมผัสโดยผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ได้ทำความสะอาดมือก่อนเข้าห้องปฏิบัติการจึงทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ-*Staphylococcus spp*.

ตารางที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างก่อนปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัสเดือนมกราคม

ลำดับ	**บริเวณที่เก็บตัวอย่าง**	**จำนวน**	**ก่อนการปฏิบัติงาน (จำนวน)**			**หลังการปฏิบัติงาน (จำนวน)**		
			B. cereus	***Staphylococcus spp.***	ร้อยละ	***B. cereus***	***Staphylococcus spp.***	ร้อยละ
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	4	-	-	-	-	1	8.33
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	4	-	1	8.33	-	2	16.66
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	4	-	1	8.33	-	2	16.66
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	4	-	-	-	-	1	8.33
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	4	-	1	8.33	-	1	8.33
6	ที่จับประตู	4	-	1	8.33	-	2	16.66
7	กล้องจุลทรรศน์	4	-	-	-	-	2	16.66
8	โต๊ะปฏิบัติงาน 1	4	-	-	-	-	2	16.66

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน	ก่อนการปฏิบัติงาน (จำนวน)			หลังการปฏิบัติงาน (จำนวน)		
			B. cereus	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ	*B. cereus*	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ
9	โต๊ะปฏิบัติงาน 2	4	-	-	-	-	2	16.66
10	โต๊ะปฏิบัติงาน 3	4	-	-	-	-	2	16.66
11	ก๊อกน้ำ	4	-	-	-	-	2	16.66
12	ตู้เย็น 4°C	4	-	-	-	-	2	16.66
รวม		48	0	5	10.41	0	21	43.75

การเก็บตัวอย่างก่อนและหลังปฏิบัติงานบนพื้นที่ปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการศึกษาเดือนที่ กุมภาพันธ์ พ.ศ.2563 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ภายในห้องปฏิบัติการแต่พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.* ก่อนปฏิบัติงานจำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6) และหลังปฏิบัติงานจำนวน 21 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 48 ตัวอย่าง ซึ่งการปนเปื้อนตามจุดต่าง ๆ ภายในห้องปฏิบัติการมาจากการสัมผัสโดยผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ได้ทำความสะอาดมือก่อนเข้าห้องปฏิบัติการ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.*

ตารางที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย Bacillus cereus และ Staphylococcus spp. ที่ได้จากตัวอย่างหลังปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส เดือนกุมภาพันธ์ **n**

ลำดับ	**บริเวณที่เก็บตัวอย่าง**	**จำนวน**	**ก่อนการปฏิบัติงาน (จำนวน)**			**หลังการปฏิบัติงาน (จำนวน)**		
			B. cereus	***Staphylococcus spp.***	ร้อยละ	***B. cereus***	***Staphylococcus spp.***	ร้อยละ
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	4	-	1	-	-	2	8.33
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	4	-	-	-	-	2	16.66
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	4	-	-	-	-	2	16.66
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	4	-	1	8.33	-	1	8.33
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	4	-	2	16.66	-	1	8.33
6	ที่จับประตู	4	-	2	16.66	-	2	16.66
7	กล้องจุลทรรศน์	4	-	-	-	-	1	8.33
8	โต๊ะปฏิบัติงาน 1	4	-	-	-	-	1	8.33
9	โต๊ะปฏิบัติงาน 2	4	-	-	-	-	1	8.33
10	โต๊ะปฏิบัติงาน 3	4	-	-	-	-	1	8.33
11	ก๊อกน้ำ	4	-	1	8.33	-	2	16.66
12	ตู้เย็น 4°C	4	-	-	-	-	2	16.66
รวม		48	0	5	10.41	0	21	43.75

ตารางที่ 7 ความถี่ของการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิด Bacillus cereus และ Staphylococcus spp.จากตัวอย่างก่อนการปฏิบัติงาน และหลังการปฏิบัติงานภายในห้องปฏิบัติการไวรัส

ลำดับ	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน	ก่อนการปฏิบัติงาน (จำนวน)			หลังการปฏิบัติงาน (จำนวน)		
			B. cereus	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ	*B. cereus*	*Staphylococcus spp.*	ร้อยละ
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	4	-	1	-	-	2	8.33
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	4	-	-	-	-	2	16.66
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	4	-	-	-	-	2	16.66
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	4	-	1	8.33	-	1	8.33
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	4	-	2	16.66	-	1	8.33
6	ที่จับประตู	4	-	2	16.66	-	2	16.66
7	กล้องจุลทรรศน์	4	-	-	-	-	1	8.33
8	โต๊ะปฏิบัติงาน 1	4	-	-	-	-	1	8.33
9	โต๊ะปฏิบัติงาน 2	4	-	-	-	-	1	8.33
10	โต๊ะปฏิบัติงาน 3	4	-	-	-	-	1	8.33
11	ก๊อกน้ำ	4	-	1	8.33	-	2	16.66
12	ตู้เย็น 4°C	4	-	-	-	-	2	16.66
รวม		48	0	5	10.41	0	21	43.75

4.4 ผลวิเคราะห์และแนวทางแก้ไข

ผลการศึกษาเมื่อเก็บตัวอย่าง ช่วงเวลาก่อนปฏิบัติงาน ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* ในการปฏิบัติงาน แต่กลับพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.* 23 ตัวอย่างจากทั้งหมดที่ทดสอบ 144 ตัวอย่าง โดยพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.* ก่อนการปฏิบัติงาน คิดเป็นร้อยละ 15.97 ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนทั้ง 23 ตัวอย่างนั้นมาจาก ผู้ปฏิบัติงาน 3 และที่จับประตู คิดเป็นร้อยละ 17.39 ของการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.*และจุดปนเปื้อนดังกล่าวยังคงเป็นจุดที่พบความถี่ของการปนเปื้อนสูงเมื่อเทียบกับจุดอื่น ๆ (ตารางที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเชื่อมโยงระหว่าง ผู้ปฏิบัติงาน และอุปกรณ์ที่เป็นจุดเก็บตัวอย่าง เนื่องจากมีการใช้อุปกรณ์ร่วมกันของผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกันทำให้พบการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.*ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับวิจัยของ Aaebtu, (2005) ที่ทำการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus aureus.* จากเจ้าหน้าที่ที่ใส่ถุงมือและไม่ใส่ถุงมือในขณะปฏิบัติงาน ในห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลแห่งหนึ่งของประเทศสิงคโปร์ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับ (พรพรรณ เกิดนาค 2558) ที่ศึกษาการปนเปื้อนภายในอาคารของโรงพยาบาลไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี โดยเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Staphylococcus spp.* เช่นเดียวกันแต่มีการพบบริเวณที่ต่างกัน บ่งบอกได้ว่า *Staphylococcus spp.*พบได้ในพื้นและในอากาศ ขณะที่งานวิจัยนี้พบได้ในบริเวณพื้นที่ผิวและวัสดุอุปกรณ์ ส่วนการศึกษา (กิตติศักดิ์ วงศ์อนุและคณะ 2558) ศึกษาในประเทศไทยยืนยันได้พบเชื้อ *Bacillus cereus* และกลุ่มเชื้อ *Staphylococcus spp.*พบได้ในอาหารที่เป็นตัวอย่างน้ำนมดิบ อย่างไรก็ตามมีโอกาสพบได้ไม่สูงหนัก (9 จาก 33 ตัวอย่าง) และจำเป็นต้องใช้วิธีตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอณูวินิจฉัย (molecular biology) เข้ามาร่วมด้วย ซึ่งเป็นวิธีที่บอกได้ว่ามีเชื้อ *Bacillus cereus* และ เชื้อ *Staphylococcus spp.*อยู่ในตัวอย่างน้ำนมดิบ แต่ไม่สามารถทราบได้ว่าจะเจริญเติบโตได้ดีในตัวอย่างน้ำนมดิบหรือไม่ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้วิธีเพาะแยกแบคทีเรีย โดยหากเชื้อไม่มีชีวิตก็ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นโคโลนีแยกออกมาได้ ในการศึกษานี้การทำความสะอาดสามารถฆ่าเชื้อ *Staphylococcus spp.* ได้ส่วนหนึ่ง และการเพิ่มความถี่ในการทำความสะอาดห้องปฏิบัติการด้วยสารฆ่าเชื้อจึงเป็นข้อเสนอแนะที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อลดการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลศึกษาที่เก็บตัวอย่างหลังปฏิบัติงาน ซึ่งไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus cereus* และพบเชื้อ *Staphylococcus spp.* 59 ตัวอย่างปนเปื้อนจากทั้งหมด 144 ตัวอย่างที่ทดสอบ *Staphylococcus spp.* คิดเป็นร้อยละ 40.97 โดยมีความถี่ที่พบการปนเปื้อนมาจากจุดเก็บตัวอย่างผู้ปฏิบัติงาน 2 ร้อยละ10.17 จุด

ผู้ปฏิบัติงาน 3 ร้อยละ10.17 และจุดเก็บตัวอย่างกล้องจุลทรรศน์ 3 ร้อยละ 10.17 ซึ่งจุดเก็บตัวอย่างผู้ปฏิบัติงาน 3 นั้น พบการปนเปื้อนก่อนปฏิบัติงานและหลังปฏิบัติงาน ส่งผลต่อการปนเปื้อนที่กล้องจุลทรรศน์ 3 หลังการปฏิบัติงาน ในขณะที่ผู้ปฏิบัติงาน 2 มีการปนเปื้อนหลังปฏิบัติงานเช่นเดียวกับแนวโน้มที่พบการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นภายหลังปฏิบัติงาน สาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนทั้งก่อนและหลังปฏิบัติงานเกิดมาจากตัวผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสและนำเอาสิ่งปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามาภายในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับความแตกต่างกันของสิ่งแวดล้อมซึ่งผู้ปฏิบัติงานรับสัมผัสมา

ผลการศึกษานี้ถูกนำเสนอและรายงานให้กับผู้ดูแลรับผิดชอบของห้องปฏิบัติการ หัวหน้านักวิทยาศาสตร์ และผู้ปฏิบัติงานทุกคนที่เกี่ยวข้องได้รับทราบ เพื่อให้เกิดการอธิบายแลกเปลี่ยนความคิดเห็นต่อจุดเก็บตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน และร่วมกันหาสาเหตุ แนวทางการป้องกันและแก้ไขที่ถูกต้องเหมาะสม เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพต่าง ๆ โดยในที่ประชุมมีความเห็นตรงกันในการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นที่ผิวสัมผัส โดยการเลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มเมทิลฟีนอล ซึ่งมีความเป็นด่าง ออกฤทธิ์ประเภทเดียวกลุ่ม ผงฟู สบู่ ยาสระผม ผงซักฟอก (น้ำยาเดทตอล Dettol) และแอลกอฮอล์ 70% ใช้ในการทำความสะอาดบนพื้นที่ผิวสัมผัส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสะดวก และชนิดของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 3 ตัว ที่ผู้ปฏิบัติงานสามารถเลือกใช้ โดยสำหรับการทำความสะอาด และมีการติดตั้งเครื่องฆ่าเชื้อโรคในอากาศภายในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หลอดรังสี UV เครื่องฆ่าเชื้อด้วยสารโอโซน ให้เป็นไปตามมาตรฐาน ส่วนสุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน โดยให้ทำความสะอาดมือก่อนเข้าห้องปฏิบัติการทุกครั้งเพื่อลดการปนเปื้อน และเพิ่มความถี่ในการสเปรย์มือด้วยแอลกอฮอล์ 70% ระหว่างวันของการปฏิบัติงาน ทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติงานนั้นได้ข้อสรุปร่วมกันให้ผู้ปฏิบัติงานล้างมือด้วยโฟมล้างมือที่จำหน่ายในท้องตลาดด้วยการเลือกใช้ยี่ห้อ (เดทตอล Dettol) และในระหว่างวันของการทำงานให้ผู้ปฏิบัติงานเพิ่มความถี่ในการสเปรย์ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดพื้นที่ผิว และทำความสะอาดมือของผู้ปฏิบัติงานอย่างสม่ำเสมอ หลังจากทำความสะอาดแล้วได้ทำการเก็บตัวอย่างซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี Swab method ดังข้อ (3.3.2 ถึงข้อ 3.3.6) และติดตามผลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.*บริเวณมือของผู้ปฏิบัติงาน (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อ Staphylococcus spp. หลังจากทำความสะอาดภายในห้องปฏิบัติการไวรัส

ลำดับที่	**บริเวณที่เก็บตัวอย่าง**	***Staphylococcus spp.***
1	ผู้ปฏิบัติงาน 1	-
2	ผู้ปฏิบัติงาน 2	-
3	ผู้ปฏิบัติงาน 3	-
4	ผู้ปฏิบัติงาน 4	-
5	ผู้ปฏิบัติงาน 5	-

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

ผลศึกษาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในพื้นที่ห้องปฏิบัติการไวรัส คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 12 จุด รวม 144 ตัวอย่าง ตลอดระยะเวลา 3 เดือน พบว่า ไม่พบการปนปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus cereus*.ซึ่งบ่งชี้ว่าห้องปฏิบัติการไวรัสนี้ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาไม่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* มีผลรวมของการตรวจพบเป็น 0 ตัวอย่าง ของตัวอย่างทั้งหมด และจึงมีความเสี่ยงต่ำต่อการติดเชื้อก่อโรคชนิดนี้ในผู้ปฏิบัติงานจาก เชื้อ *Bacillus cereus* แต่อย่างไรก็ตามมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus spp.* ซึ่งเป็นเชื้อสร้างสารพิษได้ โดยพบความถี่ที่ปนเปื้อนตามพื้นที่ปฏิบัติงาน และมือของผู้ปฏิบัติงาน โดยเฉพาะมีจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อนหลังการปฏิบัติงานเพิ่มขึ้น

การวางแนวทางปฏิบัติงานเพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน *Staphylococcus spp.* และแบคทีเรียอื่นๆ จากผู้ปฏิบัติงาน และพื้นที่สัมผัสขณะปฏิบัติงานเพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ต้องวินิจฉัยโรคในห้องปฏิบัติการนั้น จึงถูกกำหนดวิธีการและแนวปฏิบัติร่วมกัน คือ การปรับเปลี่ยนขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นที่ผิวสัมผัสและสุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน เลือกใช้น้ำยาฆ่าเชื้อกลุ่มเมทิลฟีนอล ซึ่งมีความเป็นด่าง (น้ำยาเดทตอล Dettol) และแอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดบนพื้นที่ผิวสัมผัส โดยสำหรับการทำความสะอาดฆ่าเชื้อบริเวณมือของผู้ปฏิบัติงานทั้งก่อนและหลังการปฏิบัติงานนั้นได้ข้อสรุปร่วมกันให้ผู้ปฏิบัติงานล้างมือด้วยโฟมล้างมือที่จำหน่ายในท้องตลาดด้วยการเลือกใช้ยี่ห้อ(เดทตอล Dettol) และในระหว่างวันของการทำงานให้ผู้ปฏิบัติงานเพิ่มความถี่ในการสเปรย์ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดพื้นที่ผิว และทำความสะอาดมือของผู้ปฏิบัติงานอย่างสม่ำเสมอ รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนหลังจากดำเนินการตามแนวปฏิบัติที่ปรับใหม่พบว่า ตรวจไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus spp.*บริเวณมือของผู้ปฏิบัติงาน ทั้งนี้การติดตามความต่อเนื่องของการตรวจการปนเปื้อนภายในห้องปฏิบัติการจึงควรดำเนินการอย่างสม่ำเสมอ และทางห้องปฏิบัติการมีแผนในการติดตั้งเครื่องฆ่าเชื้อโรคในอากาศภายในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หลอดรังสี UV เครื่องฆ่าเชื้อด้วยสารโอโซน ให้เป็นไปตามมาตราฐานและการฝึกอบรมเรื่องสุขอนามัยส่วนบุคคลสำหรับผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ

รายการอ้างอิง

กฤษณียา ศังขจันทรานนท์. **“ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคในโรงพยาบาลและการเปรียบเทียบการทำงานของเครื่องมือเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในอากาศ”** วิทยานิพนธ์ปริญญาสาธารณสุขศาสตร์ มหาบัณฑิตสาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2548.

จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. (2554). โรคอุจจาระร่วงจากเชื้อ อีโคไล (E.coli). Retieved 20 พฤษภาคม 2560 http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article

เฉลิมเกียรติ แสงทองพินิจ. **ปฏิบัติการสุขศาสตร์อาหารและน้ำนม.**พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์และการบริการวินิจฉัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2559.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ.**แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ โรงพิมพ์ NOBLE PRINT: กรุงเทพฯ, 2544.

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2540). **เอกสารประกอบการสอน Food Microbiology laboratory 305 312**. สาขาเทคโนโลยีอาหาร.สานักเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ฝ่ายแบคทีเรียลาไส้สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2557). ***Escherichia coli***.

ศิริพรรณ สารินทร์. **จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม** พิมพ์ครั้งที่ 1. พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ ห้างหุ่นส่วนจำกัดสามลดา, 2550.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. **จุลชีววิทยาทางการแพทย์:แบคทีเรียก่อโรค** พิมพ์ที่บริษัท จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์จำกัด, 2555.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. **การจัดจำแนกแบคทีเรียรูปร่างแกรมบวกรูปร่างทรงกลม : วงศ์ไมโครคอคเคซีอีและสเตรปโตคอคเคซีอี.** พิมพ์ครั้งที่ 1. แอคทีฟ พริ้นท์: กรุงเทพฯ, 2555

พวงทอง ไกรพิบูลย์.(2558). **โรคติดเชื้อ (Infectious disease).**Retrieved 20 พฤษภาคม http://haamor.com/th.

พรพรรณ เกิดนาค. (2558) **“การสำรวจปริมาณเชื้อ Staphylococcus aureus ในอากาศภายในโรงพยาบาลไทรน้อย”** จังหวัดนนทบุรี ด้วยวิธีการวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาบัณฑิตสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2558.

ภาคภูมิ กนกพรเวโรจน์ รัชรณ วารินทร์ จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ และ ปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล. **“การตรวจวิเคราะห์ Bacillus cereus ในอาหารโดยเทคนิคพีซีอาร์”** สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 2558.

อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ **“การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของบาซิลลัสรูปแบบใหม่และมีประสิทธิภาพสูง โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กร่วมกับอาหารบ่งชี้ที่มีสี”** สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**,** 2561

Adebotu, T.L. “Survey of the microbial flora of the hospital environment in southwern Nigeria.” **Journal of Food.** Agriculture & Environment 3, 1 (March 2005): 11-12.

Becerra, S.C., Roy, D.C., Sanchez, C.J. et al. An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. **BMC Res Notes** 9,216(2016).

United States Food and Drug Administration, (1998). **Bacteriological analytical manual / Food and Drug Administration**, 8th ed. MD: AOAC International, Gaithersburg.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทิพย์วรรณ ทองดอนเหมือน
วัน เดือน ปี เกิด	16 เมษายน พ.ศ. 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดนครปฐม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาปริญญาศิลปศาสตรบัณฑิต สาขาการพัฒนาชุมชน คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	85 หมู่ 2 ตำบลดอนข่อย อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140