บทความพิเศษ

เทคนิคทางแบคทีเรียในการควบคุมการทำงานของเครื่องมือทำให้ปราศจากจุลชีพ

อนันต์ จงเถลิง*

Chongthaleong A. Bacteriological control of sterilizing equipment. Chula Med J 1990 Nov; 34(11) : 829-833

It is essential that all sterilizing equipment (autoclave, gas and oven sterilizers) be operated correctly, maintained in good working order, and checked regularly at monthly intervals for bacteriological safety.

Results of a bacteriological test reflect only the particular conditions existing in the sterilizer at the time the test was made. The accuracy depends on the careful standardization of all techniques involved by constant supervision of and attention to every necessary detial. Indicators that change in color at sterilizing temperatures are required for every run. These materials ensure that a given load has been exposed to the desired temperature but they do not indicate the total time of the exposure.

Monthly bacteriological controls should be used to check each factor involved in sterilization, that the method of packing or wrapping individual items, method of loading items together in the sterilizer, the time and temperature used for load and the mechanical efficiency of the sterilizer. When properly performed, bacteriological testing provides information of these factors.

Reprint request : Chongthaleong A, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. September 10, 1990.

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในทางการแพทย์มีความจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ปราศจากจุลชีพจำนวนมากเพื่อบำบัดรักษาผู้ป่วย ในปัจจุบันมีเครื่องมือสำหรับวัตถุประสงค์ดังกล่าว 4 กลุ่ม คือ

ก. Autoclave

ข. Gas sterilizer

ค. Oven sterilizer

ง. Radiation

เนื่องจากการใช้ Radiation sterilizer ต้องอาศัยระบบป้องกันรังสี ทำให้มีต้นทุนสูงมาก จึงมักใช้ในกิจกรรมของโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องมือทางการแพทย์ปราศจากจุลชีพเท่านั้น ดังนั้น จึงจะกล่าวถึงเฉพาะ Oven sterilizer, Autoclave และ Gas sterilizer

โดยที่ผู้ใช้เครื่องมือ เครื่องใช้ ที่ปราศจากจุลชีพต้องการความมั่นใจถึงความปลอดภัยจากการติดจุลชีพจากเครื่องมือดังนั้นผู้ที่ดำเนินการทำลายจุลชีพด้วยเครื่องมือต่าง ๆ จำเป็นต้องกระทำอย่างถูกต้อง บำรุงรักษา และหมั่นตรวจสอบเครื่องมือทำลายจุลชีพอย่างสม่ำเสมอ

การทำให้ปราศจากจุลชีพด้วยเครื่องนึ่งทำลายจุลชีพ (autoclave) ซึ่งอาศัยไอน้ำภายใต้ความดัน เตาอบ (oven) ซึ่งอาศัยอากาศร้อน และก๊าซ เช่น Ethylene oxide จะต้องกระทำในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธีนั้น ๆ รวมทั้งระยะเวลาที่เพียงพอที่จะทำลายจุลชีพทุกรูปแบบ (form) ซึ่งรวมถึงสปอร์ของจุลชีพ

ตัวทำให้ปราศจากจุลชีพ และ เวลาที่ใช้

ภายในเครื่องมือทำให้ปราศจากจุลชีพจะต้องมีตัวทำให้ปราศจากจุลชีพ (sterilizing agent) ไม่ว่าจะเป็น ไอน้ำ อากาศร้อน หรือก๊าซ ที่เพียงพอในทุก ๆ จุด ทุกรายการในเวลาที่เพียงพอ ซึ่งหมายความถึง

1. ในเครื่องนึ่งทำลายจุลชีพ (autoclave) จะต้องมีไอน้ำที่มีอุณหภูมิถูกต้องเข้าไปแทนที่อากาศทั้งหมด และแทรกเข้าไปในทุก ๆ รายการของที่ต้องการทำลายจุลชีพ โดยทั่วไปเรามักกระทำกันที่ไอน้ำอุณหภูมิ 121°ซ ซึ่งจะต้องอาศัยไอน้ำความดัน 15 ถึง 18 ปอนด์/ตารางนิ้ว แต่สำหรับในห้องผ่าตัดที่ต้องการความรวดเร็วมักจะใช้อุณหภูมิ 132°ซ ซึ่งต้องอาศัยไอน้ำภายใต้ความดัน 27 ถึง 30 ปอนด์/ตารางนิ้ว ระยะเวลาสำหรับการนึ่งทำลายจุลชีพภายใต้อุณหภูมิหนึ่ง ๆ จะขึ้นกับขนาดชนิดของวัสดุที่ให้ปราศจากจุลชีพและการจัดเรียงวัสดุภายในห้องนึ่งทำลายจุลชีพกล่าวคือที่อุณหภูมิ 121°ซ อาจต้องใช้เวลาตั้งแต่ 15 นาที (น้อยที่สุด) จนถึง 45 นาที แต่ถ้าใช้ความร้อนอุณหภูมิ 132°ซ จะใช้เวลาตั้งแต่ 3 ถึง 10 นาที กับการบรรจุและวิธีการห่อวัสดุ

2. ในเตาอบ (oven) จะต้องมีอากาศร้อนที่มีอุณหภูมิซึ่งสามารถทำลายจุลชีพไหลเวียนอย่างอิสระ เพื่อว่าพื้นผิวของวัสดุทุกรายการจะได้รับความร้อนอย่างทั่วถึง ความคงตัวของวัสดุที่ทนต่อความร้อน (heat stability) เป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกใช้ระยะเวลาในการอบ กล่าวคือ ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำลงก็จะต้องเพิ่มระยะเวลาให้มากขึ้น โดยทั่วไปเรามักใช้อุณหภูมิ 160°ซ เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หรือใช้อุณหภูมิ 180°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 160°ซ จะต้องใช้เวลานานมาก ซึ่งไม่เหมาะในเชิงปฏิบัติการ แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงกว่า 180°ซ วัสดุต่าง ๆ ที่ต้องการให้ปราศจากจุลชีพก็มักจะถูกทำลายเสียสภาพไป

3. ในการใช้เครื่องอบทำลายจุลชีพด้วยก๊าซ (gas sterilizer) อากาศภายในตู้จะต้องถูกแทนที่ด้วยก๊าซ ซึ่งก๊าซภายในตู้จะต้องมีความเข้มข้นที่มากพอในอุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม สำหรับระยะเวลาจะขึ้นกับลักษณะการบรรจุ (load) ภายในตู้ ในกรณีที่วัสดุที่ต้องการทำให้ปราศจากจุลชีพ มักจะใช้อุณหภูมิ 115°ซ ถึง 130°ซ ภายใต้ความดัน 25 ถึง 28 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

การบรรจุ (load)

การบรรจุวัสดุที่ต้องการทำให้ปราศจากจุลชีพ จะมีผลอย่างมากต่อประสิทธิผลของขบวนการทำให้ปราศจากจุลชีพ จึงมีความจำเป็นจะต้องจัดเรียงวัสดุภายในตู้อย่างถูกต้องเหมาะสม

1. วัสดุแต่ละห่อไม่ควรมีขนาดใหญ่เกินไปเพราะตัวทำให้ปราศจากจุลชีพ (sterilizing agents) อาจจะไม่สามารถผ่านไปสัมผัสได้อย่างทั่วถึงหรือมากพอ

2. การใช้ autoclave หรือ gas sterilizer ควรแยกห่อวัสดุแต่ละรายการเพื่อที่ไอน้ำหรือก๊าซจะได้สัมผัสวัสดุนั้น ๆ อย่างทั่วถึง เช่นกรณีของ กระบอกฉีดยา

3. การจัดเรียงวัสดุภายในตู้ จะต้องกระทำอย่างพิจารณาให้ ไอน้ำ ก๊าซ หรืออากาศร้อนผ่านวัสดุแต่ละรายการอย่างอิสระเพื่อที่วัสดุแต่ละรายการจะได้รับไอน้ำ ก๊าซ หรืออากาศร้อนอย่างทั่วถึงเพียงพอต่อการทำลายจุลชีพ

4. ลักษณะ (nature) และขนาดของวัสดุจะเป็นตัวกำหนดของตัวทำลายจุลชีพ และระยะเวลาที่ใช้ ซึ่งเวลาจะเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมากในการ ใช้ autoclave

เครื่องมือ และผู้ใช้เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้เป็นปัจจัยสำคัญ ที่จะทำให้ขบวนการทำให้ปราศจากจุลชีพสัมฤทธิ์ผลเพียงใด ในปัจจุบันมีเครื่องมือที่ควบคุมโดยอัตโนมัติ ใช้ไมโครโพเซสเซอร์เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการใช้งาน แต่อย่างไรก็ตามผู้ควบคุมเครื่องจำเป็นจะต้องเข้าใจถึงหลักการ และวิธีการทำงานของเครื่องมือรวมทั้งสามารถที่จะรู้จักสังเกตถึงความผิดปกติในทันทีที่ขบวนการทำให้ปราศจากจุลชีพมีปัญหาเกิดขึ้น

ในกรณีของเครื่อง autoclave ที่มีระบบควบคุมอัตโนมัติ ซึ่งมีใช้อยู่มากในปัจจุบันจุดที่ควรให้ความสำคัญดังนี้

1. เครื่องตั้งเวลา (timer) เป็นนาฬิกา ควรมีการตรวจสอบว่าเวลานั้นถูกต้องเพียงใดกับนาฬิกามาตรฐานที่เชื่อถือได้ อย่างสม่ำเสมอ

2. เวลาที่ใช้ในขบวนการทำลายจุลชีพ หมายถึงเวลาที่นับตั้งแต่ไอน้ำมีอุณหภูมิตามที่กำหนดไว้ มิได้หมายถึงตั้งแต่เริ่มเปิดเครื่อง จึงไม่ควรเริ่มนับเวลาเมื่อมีอุณหภูมิภายในตู้ก่อนที่อุณหภูมิในตู้จะถึง 120°ซ

3. ท่อระบายอากาศ ซึ่งอยู่ภายในตู้บริเวณพื้นด้านล่างใกล้ประตูจะต้องไม่อุดตันโดยวัสดุจะอบหรือสิ่งสกปรก จึงควรทำความสะอาดท่อดังกล่าวอยู่เสมอ

4. หากมีความผิดปกติใด ๆ เกิดขึ้น เช่น ใช้เวลานานขึ้น นับตั้งแต่เปิดเครื่องจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ จะต้องรีบรายงานให้ฝ่ายช่างทำการตรวจสอบหาข้อผิดปกติ

การทำสอบเครื่องทำให้ปราศจากจุลชีพด้วยวิธีทางแบคทีเรีย

มีผู้เข้าใจผิดถึงเทปกาวที่เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลหรือดำเมื่อถูกความร้อนที่กำหนดว่าขบวนการทำให้ปราศจากจุลชีพบรรลุถึงเป้าหมายแล้ว แต่แท้จริงแล้ว indicator ดังกล่าวไม่สามารถบอกว่าอุณหภูมินั้นมีระยะเวลานานเพียงพอหรือไม่ จึงจำเป็นจะต้องมีการทดสอบทางแบคทีเรียอย่างสม่ำเสมออย่างน้อยทุกเดือน แม้ว่าผลการตรวจสอบทางแบคทีเรียจะสะท้อนให้เห็นถึงประสิทธิผลของเครื่องทำให้ปราศจากจุลชีพ ณ เวลาที่ทำการทดสอบ และด้วยเงื่อนไขในวิธีการบรรจุ (load) นั้น ๆ ก็ไม่ได้รับประกันวิธีการบรรจุแบบอื่นในเวลาอื่น กล่าวคือความปลอดภัยจะขึ้นกับมาตรฐานของเทคนิคที่เกี่ยวข้อง และดูแลเอาใจใส่ในขั้นตอนต่าง ๆ อย่างสม่ำเสมอ

การตรวจสอบประสิทธิผลของเครื่องทำให้ปราศจากจุลชีพด้วยวิธีทางชีวภาพ นิยมใช้สปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* สำหรับเครื่อง autoclave และ *Bacillus subtilis* สำหรับเครื่องอบทำลายจุลชีพด้วยก๊าซ ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (kit) สำหรับการตรวจดังกล่าว เช่น Attest^{R} (3M Company, ST,Paul, MN), Spordi^{R} (Amsco Medical Product, Erie, PA), Spodex^{R} (American Sterilizer Company) เป็นต้น

ขั้นตอนการทดสอบทางชีวภาพ กระทำในสภาพคล้ายคลึงกับขบวนการทำให้ปราศจากจุลชีพตามปกติ

1. การทดสอบเครื่อง autoclave จะใช้สปอร์ของ *B. stearothermophilus* ซึ่งเคลือบบนแถบกระดาษบรรจุในหลอดแก้วปิดจุกสำลี หรือหลอดพลาสติกที่ปิดด้วยกระดาษบรรจุสปอร์ของแบคทีเรียดังกล่าวในห่อผ้า ดังรูป และอาจบรรจุกระดาษเคลือบสารเคมีที่เปลี่ยนสีเมื่ออุณหภูมิสูงถึงกำหนดไว้ด้วยเพื่อตรวจสอบอุณหภูมิของไอน้ำภายในเครื่อง autoclave ในกรณีที่เครื่อง autoclave ขนาดใหญ่มีความจำเป็นต้องใช้หลอดบรรจุสปอร์มากกว่า 1 หลอด เพื่อให้การตรวจสอบเป็นไปอย่างทั่วถึง โดยมีหลักการดังนี้

ก. เครื่อง autoclave ตั้งโต๊ะขนาดเล็ก ใช้สปอร์ 1 หลอด

ข. เครื่อง autoclave ตั้งพื้นถาดเดียว ใช้สปอร์ 3 หลอด

ค. เครื่อง autoclave ตั้งพื้น หรือผนังถาดคู่ ใช้สปอร์ 4 หลอด

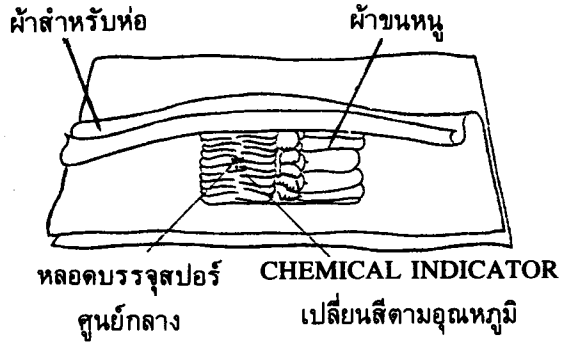

Figure 1. Location of biological and chemical indicators with the test pack.

2. การทดสอบการทำลายจุลชีพด้วยก๊าซจะต้องมีความระมัดระวัง เนื่องจากก๊าซที่ใช้อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดสอบได้ จึงควรบรรจุหลอดที่บรรจุสปอร์ลงในกระบอกฉีดยาแก้วหรือพลาสติกขนาด 20 มล. ไม่ติดเข็มแล้วบรรจุลงในถุงสำหรับการอบก๊าซปิดผนึก แล้วบรรจุลงในตำแหน่งกึ่งกลางของวัสดุที่ต้องการอบทำลายจุลชีพ จากนั้นดำเนินตามขั้นตอนปกติของขบวนการอบทำลายจุลชีพด้วยก๊าซ

3. นำสปอร์ของแบคทีเรียที่ผ่านขบวนการทำลายจุลชีพแล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงจุลชีพ trypticase soy broth 5 มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ (สำหรับ *B.subtilis*) หรือ 56°ซ (สำหรับ *B.stearothermophilus*) เป็นเวลา 7 วัน ในกรณีที่ใช้อุปกรณ์ของ Attest^{R} เมื่อปล่อยให้เย็นเป็นเวลา 10 นาที แล้วให้บีบหลอดแก้วบรรจุอาหารเลี้ยงจุลชีพซึ่งอยู่ภายในหลอดพลาสติกให้แตกแล้วบ่มเพาะในอ่างน้ำร้อนหรือตู้อบอุณหภูมิ 37°ซ หรือ 56°ซ นาน 48 ชั่วโมง เพื่ออ่านผลแล้วบ่มเพาะต่ออีก 5 วัน

4. ตรวจสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงจุลชีพทุกวัน

5. หากพบจุลชีพขึ้นในอาหารเลี้ยงจุลชีพให้ทำการย้อมสีแกรม และดำเนินขบวนการวิเคราะห์เพื่อ identify จุลชีพต่อไป

6. เพื่อป้องกันความผิดพลาด เนื่องจากการปนเปื้อนของจุลชีพแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงจุลชีพ tryptic soy broth จึงต้องมีการตรวจสอบโดยบ่มเพาะ (incubate) หลอดอาหารเลี้ยงจุลชีพที่ไม่ได้ใส่สปอร์ของจุลชีพควบคู่ไปด้วย

7. มีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่จะต้องลงรหัสบนหลอดสปอร์ก่อนที่จะบรรจุลงในเครื่องทำให้ปราศจากจุลชีพ เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลที่จะนำมาวิเคราะห์ต่อไป คือ

ก. ตำแหน่งที่วางหลอดบรรจุสปอร์

ข. วัน เวลา ที่ทำการทดสอบ

ค. รายละเอียดขบวนการที่ใช้

ง. ผู้ดำเนินการใช้เครื่องมือ

การแปลผล

การรายงานผลว่าไม่มีจุลชีพขึ้น หรือขบวนการทำลายจุลชีพสมบูรณ์จะต้องรอการบ่มเพาะจุลชีพ 7 วัน หากมีจุลชีพเจริญเติบโตขึ้นแสดงว่าสปอร์ของจุลชีพแบคทีเรียไม่ได้ถูกทำลาย ซึ่งอาจมีสาเหตุได้จาก

1. หลอดบรรจุสปอร์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบไม่ได้วางในตำแหน่งที่ถูกต้อง

2. การห่อหลอดบรรจุสปอร์กระทำไม่ถูกต้อง

3. การจัดเรียงบรรจุสิ่งของที่จะใช้ในการทำให้ปราศจากจุลชีพทั้งหมดกระทำไม่ถูกต้อง

4. เครื่องมือทำลายจุลชีพทำงานบกพร่อง

5. มีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในขบวนการเพาะจุลชีพในห้องปฏิบัติการ

หากการทดสอบให้ผลบวก หรือมีจุลชีพเจริญเติบโตขึ้น จะต้องตรวจสอบตั้งแต่ข้อที่ 1 ถึง 4 โดยผู้ที่รับผิดชอบและผู้ชำนาญการ พร้อมกับมีการทดสอบใหม่เมื่อมีการแก้ไขข้อบกพร่องแล้ว ห้ามทำการใช้เครื่องเพื่อการทำลายให้ปราศจากจุลชีพอีกจนกว่าการทดสอบจะให้ผลลบ

ข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบัน ประเทศไทยมีการใช้เครื่องมือทำให้ปราศจากจุลชีพอย่างไม่ถูกต้องจำนวนมาก เช่น ในคลินิก หรือ โรงพยาบาลขนาดเล็ก มักจะมีเครื่องนึ่งไว้ใช้เอง แต่ไม่มีการอบรมบุคลากรให้มีการใช้เครื่องให้ถูกต้องและส่วนใหญ่เข้าใจผิดว่ากระดาษกาวที่เปลี่ยนสีเมื่อถูกความร้อนเป็นระบบควบคุมคุณภาพที่เพียงพอแล้ว แม้แต่บุคลากรจำนวนมากในโรงพยาบาลขนาดใหญ่และโรงเรียนแพทย์บางแห่งก็ยังมีความเข้าใจเช่นนั้นจึงละเลยระบบควบคุมคุณภาพที่ถูกต้อง ควรจะมีหน่วยงานของกระทรวงสาธารณสุขเข้ามารับผิดชอบอบรมบุคลากรตรวจสอบการใช้เครื่องมือเหล่านี้ให้ถูกต้อง

อ้างอิง

1. Buhlmann X, Gay M, Schiller I. Test objects containing Baccillus stearothermophilus spores for the monitoring of antimicrobial treatment in steam autoclaves. Results obtained with commercial preparations and with the authors' own test objects. Pharm Acta Helv 1973 Apr; 48 : 223-4
2. Doyle JE, Ernst RR. Influence of various pretreatments (carries, desiccation, and relative cleanliness) on the destruction of Bacillus subtilis var, niger spores with gaseous ethylene oxide. J Pharm Sci 1968 Mar; 37 : 433-6
3. Epstein BJ, Lattimer JM, Matsen JM, Garibaldi RA. False positive spore strip sterility tests with steam sterilization. Am J Infect Control 1983 Apr; 11(2) : 71-3
4. Gillis JR. Biological indicators for steam sterilization process monitoring. Bull Parentel Drug Assoc 1975 May-Jun; 29(3) : 111-2
5. Gurevich I, Holmes JE, Cunha BA. Presumed autoclave failure due to false-positive spore strip tests. Infect Control 1982 Sep-Oct; 3(5) : 388-92
6. Kotilainen HR, Gantz NM. Biological sterilization monitors: a four-year in use evaluation of two systems. Infect Control 1985 Nov; 6(11) : 451-5
7. Maki DG, Alvarado C, Hassemer C, Davis JP. False positive results of spore tests in ethylene oxide sterilizers-Wisconsin. MMWR 1981 May 29; 30(20) : 238-40
8. Mayernik JJ. Biological indicators for steam sterilization - a U.S.P. collaborative study. Bull Parenter Drug Assoc 1972 Sep-Oct; 26(5) : 205-11
9. Oxborrow GS, Placencia AM, Danielson JW. Effects of temperature and relative humidity of biological indicators used for ethylene oxide sterilization. Appl Environ Microbial 1983 Feb; 45(2) : 546-9
10. Whitbourne JE, Reich RR. Ethylene oxide biological indicators: need for stricter qualifications testing control. J Parenter Drug Assoc 1979 May-Jun; 33(3) : 132-43