

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อของลูกบิดประตูห้องแยกผู้ป่วยด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งที่ไวและคือต่อยา methicillin เป็นการวิจัยเชิงสำรวจโดยใช้การทดสอบทางจุลชีวิทยา โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

ประชากร ที่ใช้ในการวิจัยเป็น ลูกบิดประตูห้องแยกในหอผู้ป่วย แผนกอายุรกรรม ศัลยกรรม และหออภิบาลผู้ป่วยหนัก ของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จำนวนทั้งสิ้น 9 หอ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ลูกบิดประตูทั้งด้านในและด้านนอกของห้องแยกหอผู้ป่วย โดยแบ่งหอผู้ป่วยออกเป็น 3 แผนก (stratified sampling) จำนวนหอทั้งหมด 9 หอ (ward) โดยเอาห้องแยกทุกห้องที่อยู่ในหอผู้ป่วย ซึ่งมีทั้งหมด 14 ห้อง เก็บตัวอย่างเฉพาะห้องแยกที่มีผู้ป่วยพักรักษาตัวอยู่เท่านั้น ซึ่งในห้องแยกผู้ป่วยจะมีประตูเข้าออก 1 ประตู จะเก็บตัวอย่างโดย swab ลูกบิดประตูด้านนอก 1 ตัวอย่าง และ swab ลูกบิดประตูด้านใน 1 ตัวอย่าง รวมประตู 1 ประตู มี 2 ตัวอย่าง และ swab จนกว่าจะครบในแต่ละแผนก โดยตำแหน่งที่ swab ลูกบิดประตูห้องแยกคือตำแหน่งที่มือจับเปิดและปิดประตู โดยเก็บแผนกละ 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นลูกบิดประตูห้องแยกด้านนอก 30 ตัวอย่าง ลูกบิดประตูห้องแยกด้านใน 30 ตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียที่ปนเปื้อนที่ลูกบิดประตูห้องแยกผู้ป่วย โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม - พฤศจิกายน 2547 โดยวิธีการ swab (swab) พื้นที่ 4 ตารางนิ้ว (Bennett J.V., et al., 1976) เพื่อทำการวิเคราะห์ หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total bacterial counts) หาปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* และหาเชื้อ *S. aureus* ที่คือและไวต่อยา methicillin (MRSA, MSSA) และเชื้อ

อื่น ๆ โดยวิธี spread plate method ตาม Manual of Clinical Microbiology (Patrick., *et al.*, 1999)

การเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งต้องนำตัวอย่างจากจุดเก็บมาตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวิเคราะห์ภายใน 6 ชั่วโมง และเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย จึงต้องเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ภายในกระติกน้ำแข็ง และนำไปตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทางแบคทีเรีย แผนกจุลชีววิทยา โรงพยาบาลหาดใหญ่

การเก็บตัวอย่างจะ swab ลูกบิดประตู โดยวางกระดาษที่ตัดให้มีช่องว่างพื้นที่ ขนาด 4 ตารางนิ้ว และผ่านการฆ่าเชื้อ (Sterile) แล้วนำไปทาบนลูกบิดประตูตำแหน่งที่จับสำหรับเปิดประตู มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1. การเตรียมไม้พันสำลี (cotton Swab)

1.1 ใส่ไม้พันสำลีในหลอดแก้ว (tube) ที่มีฝาเกลียวปิด

1.2 นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอ้อไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

2.1 ละลาย 34.0 กรัม ของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ในน้ำกลั่น (Distilled Water) 500 มิลลิลิตร ปรับสภาพพีเอชให้ได้ $7.2 + 0.5$ ด้วยการใส่โซเดียม ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (ใช้ NaOH 40.0 กรัม ผสมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) เก็บไว้ในตู้เย็น

2.2 คูณสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ด้วยปิเปตจำนวน 1.25 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย แมกนีเซียมซัลเฟต 5.0 มิลลิลิตร (เตรียมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตโดยการละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 50 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร)

2.3 คว่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 และ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอ้อไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. วิธีการสวอป

3.1 การสวอปลูกบิดประตูห้องแยก ต้องทำด้วยความระมัดระวังโดยการใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) อย่างจับต้องส่วนที่จะทำการสวอป

3.2 ใช้ไม้พันสำลี (sterile cotton swab) 1 อัน ต่อมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution) 1 หลอด 10 มิลลิลิตร และต่อตำแหน่งสวอป 1 ตำแหน่ง โดยที่การเปิดฝาหลอดไม้พันสำลี หยิบส่วนปลายไม้พันสำลีขึ้นมา ไม้พันสำลีถ้าใช้ไม่หมดในคราวเดียวห้ามนำกลับมาใช้อีก ให้นำไปฆ่าเชื้อโรคาใหม่

3.3 เปิดฝาจุลินทรีย์สารละลายบัพเฟอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว โดยต้องจับที่ก้นหลอดเปิดฝาจุลินทรีย์โดยใช้นิ้วก้อยจับฝาจุลินทรีย์ขณะที่เปิด แล้วลนปลายหลอดด้วยไฟ จากตะเกียงอัลกอฮอล์ เสร็จแล้วใช้ไม้พันสำลีจุ่มในสารละลายบัพเฟอร์ และหรือบิดกับผิวด้านในหลอดแก้วเพื่อให้สำลีเปียกพอสมควร

3.4 เอาไม้พันสำลีทำการป้ายหรือฉูดพื้นผิวด้านหน้าของตำแหน่งตัวอย่างที่ต้องการสาวอป โดยฉูดกลับไปกลับมา 3 ครั้งซ้ำๆ พร้อมกับหมุนไม้ไปด้วย

3.5 เมื่อป้ายหรือฉูดตำแหน่งที่ต้องการเรียบร้อยแล้วเอาไม้พันสำลีดังกล่าวเก็บไว้ในหลอดบรรจุสารละลายบัพเฟอร์เดิม โดยหักค้ำไม้พันสำลีส่วนที่เหนือมือจับกับปากหลอดแก้วทิ้ง ลนไฟที่รอบปากหลอดแล้วปิดจุลินทรีย์ให้แน่นสนิท

3.6 เขียนสัญลักษณ์บนหลอดแก้ว เพื่อระบุชื่อตัวอย่างที่เก็บ สถานที่ และวัน เดือน ปี ที่เก็บ

3.7 เก็บหลอดบรรจุตัวอย่าง ใส่ที่วางหลอดทดลอง (rack) บรรจุไว้ในคลูเลอร์หรือกระติกน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการทางแบคทีเรีย

การวิเคราะห์ตัวอย่างทางแบคทีเรียวิทยา

การวิเคราะห์ทางด้านแบคทีเรีย ใช้วิธี spread plate method และการทดสอบทางด้านชีวเคมี โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีนับจำนวนโคโลนี (colony) จากจานเพาะเชื้อมาตรฐาน (standard plate count) เป็นการตรวจวิเคราะห์หาค่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่าง โดยมีสมมุติฐานว่าโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (agar) ซึ่งมีสารอาหารสำหรับให้แบคทีเรียเจริญเติบโตในระหว่างการเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง หนึ่งโคโลนี เจริญมาจากเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหนึ่งเซลล์จำนวนโคโลนีที่นับได้บนจานเพาะเชื้อ คูณกับส่วนกลับของอัตราเจือจางที่ใช้จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร ซึ่งรายงานผลเป็น colony forming units (CFU/ml) และเมื่อคูณกับจำนวนปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก็จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อพื้นที่ทั้งหมดในที่นี้คือ 4 ตารางนิ้ว การตรวจวิเคราะห์ total bacterial counts มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

1.1 เขี่ยน้ำตัวอย่าง (ตามจุดที่ swab ตำแหน่งต่าง ๆ) ในหลอดแต่ละตัวอย่างให้เข้ากันดี ทำ dilution 1:10 และ 1:100 โดยเจือจางด้วยสารละลายบัพเฟอร์ โดยปีเปิดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัพเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เป็น dilution 1:10 เขย่าและปีเปิดน้ำที่

dilution 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เป็น dilution 1:100

1.2 เข่าน้ำตัวอย่างในหลอด undilute แต่ละตัวอย่างให้เข้ากันดี ปิเปิดน้ำ undilute 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบน nutrient agar (NA) (ทำ duplicate) เขียนสัญลักษณ์ ลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัววี (V) spread ให้ทั่วผิวหน้าของ nutrient agar

1.3 เข่าน้ำและ ปิเปิดน้ำแต่ละตัวอย่างที่ dilution 1:10 ลงบน NA จานละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัววี (V) spread ให้ทั่วผิวหน้า NA เขียนสัญลักษณ์ ลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ

1.4 เข่าน้ำและ ปิเปิดน้ำแต่ละตัวอย่างที่ dilution 1:100 ลงบน NA จานละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัววี (V) spread ให้ทั่วผิวหน้า NA เขียนสัญลักษณ์ ลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ

1.5 หยดน้ำตัวอย่าง undilute 1 หยดลงบน blood agar (BA)) และ MacConkey (MC) เขียนสัญลักษณ์ ลงบนฝาจานเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัววี (V) spread ให้ทั่วผิวหน้า บน BA และ MC

1.6 incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส สำหรับ plate BA และ MC ให้ incubate 18-24 ชั่วโมงและสำหรับ NA ให้ incubate 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ที่ขึ้นบน NA โดยเลือกนับจานเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนเชื้อ โดยคูณกับส่วนกลับของอัตราเจือจางที่ใช้ จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรซึ่งรายงานผลเป็น colony forming units (CFU/ml) และเมื่อคูณกับจำนวนปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างก็ จะเท่ากับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดต่อพื้นที่ทั้งหมดในที่นี้คือ 4 ตารางนิ้ว ส่วนการนับจำนวนโคโลนี ของเชื้อ *Staphylococcus* ให้เลือกนับโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus* ส่วนการคำนวณจำนวนโคโลนีของเชื้อนี้ก็ทำเช่นเดียวกับการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

2. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี spread plate method (Manual of Clinical Microbiology) หลังจาก incubate เชื้อบน BA ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาตรวจลักษณะโคโลนี ถ้าเชื้อไม่ขึ้นให้เพาะต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง และทำการย้อมแกรม เพื่อคุณสมบัติของการติดสีแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย โดยเชื้อ *Staphylococcus* จะย้อมติดสีแกรมบวกคือสีม่วง ลักษณะโคโลนีกลมอยู่เป็นกลุ่มเล็กบ้างใหญ่บ้างกระจายกระจายทั่วไป อาจหลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรืออาจต่อเป็นสายสั้น ๆ โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์ หลังจากนั้นทำการแยก (isolation) โคโลนีของ *Staphylococcus* ใส่ในอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) ที่มี BHI 0.5-1 ml นำไปอบ (incubate) ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี (biochemical test) เพื่อยืนยันผล

ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี (biochemical test)

การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี มี 2 อย่างคือ ดูปฏิกิริยา coagulase และ ปฏิกิริยาการหมักข่อยน้ำตาล

1. Coagulase เชื้อ *S. aureus* จะสร้างเอนไซม์ coagulase ซึ่งทำให้พลาสมาแข็งตัวได้มี 2 ชนิด คือ

Bound coagulase (clumping factor) เชื่อว่าเป็น enzyme ที่จะมีปฏิกิริยากับ fibrinogen ในพลาสมาทำให้เลือดแข็งตัว

Free coagulase เอนไซม์นี้จะทำให้พลาสมาแข็งตัว ทำให้ร่างกายของโฮสต์ไม่สามารถกำจัดเชื้อโดยเม็ดเลือดขาวได้ โดยที่เอนไซม์จะไปจับกับ coagulase reacting factor (CRF) ในพลาสมาทำให้โปรทรอมบิน (prothrombin) เปลี่ยนไปเป็นทรอมบิน(thrombin) และไฟบรินโนเจน (fibrinogen) เปลี่ยนเป็นไฟบริน (fibrin) ทำให้เลือดแข็งตัว ทำให้เม็ดเลือดขาวไม่สามารถจับทำลายเชื้อได้

2. ปฏิกิริยาการหมักข่อยน้ำตาล เชื้อ *S. aureus* สามารถหมักข่อยน้ำตาลได้หลายชนิดทำให้เกิดกรดแลคติก แต่ไม่เกิดก๊าซ ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถหมักข่อยน้ำตาล ได้แก่ *S. epidermidis*

วิธีการทดสอบ หาเชื้อ *S. aureus* มีดังนี้

1. Coagulase test โดยใช้ loop ปรุจากเชื้อ ตักเชื้อจากอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) ที่ incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงแล้ว ใส่ลงในหลอดที่มีพลาสมา (ที่เจือจางด้วย trypticase soy broth ในอัตราส่วน 1:4) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร

2. PR glucose และ PR mannitol ใช้ loop หรือ needle ที่ปรุจากเชื้อตักเชื้อจากอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) มาใส่ (stab) ลงในหลอดที่มี PR glucose และ PR mannitol

นำหลอดที่ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีทั้งหมดไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผล

การแปลผลปฏิกิริยาชีวเคมี (biochemical test)

1. Coagulase test ถ้า plasma แข็งตัว (จับกันเป็นก้อน) รายงานผลเป็น positive

2. PR glucose และ PR mannitol เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง รายงานผลเป็น positive

จากปฏิกิริยาชีวเคมี coagulase test , PR glucose และ PR mannitol ผลเป็น positive แสดงว่าเชื้อนั้นเป็น *S. aureus*

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์

เป็นวิธีที่แนะนำโดย National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) โดยวิธี agar diffusion method ยาต้านจุลชีพที่เลือกในการทดสอบคือ oxacillin ที่มีจำนวนยา 1 ไมโครกรัม เป็นตัวทดสอบ ใช้แทน methicillin เนื่องจาก methicillin เป็นยาต้านจุลชีพที่สลายตัวได้ง่าย (McDougal LK.; Thomsberry C., 1984)

วิธีการทดสอบ

เลือกโคโลนีเชื้อ *S. aureus* ที่อยู่เดี่ยว ๆ 1-2 โคโลนี โดยใช้ loop และเฉพาะส่วนบนของโคโลนี แล้วนำมาใส่ในหลอดที่มีอาหารเหลว BHI 1 มิลลิลิตร นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ให้มีความขุ่นเพียงพอ นำมาปรับความขุ่นให้ได้ความขุ่นเท่ากับ ความขุ่นมาตรฐานคือ 0.5 McFarland's standard โดยยกหลอดที่บรรจุแบคทีเรีย และหลอดความขุ่นมาตรฐานขึ้นดูความขุ่น ปรับความขุ่นของเชื้อด้วย BHI โดยใช้ capillary pipet ที่ปราศจากเชื้อโดยหยด BHI ลงในหลอดเชื้อที่ละหยด เขย่าให้เข้ากันจนมีความขุ่นเท่ากัน เมื่อปรับความขุ่นแล้วให้ทำการทดสอบภายใน 15 นาที ใช้ไม้พันสำลี (swab) ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่เทียบความขุ่นแล้วบิดให้หมาด ๆ กับข้างหลอดแล้วนำมาป้ายบน Mueller hinton agar (MHA) ที่ผึ่งผิวหน้าให้แห้งแล้ว โดยลากเส้นผ่านกึ่งกลางจานเพาะเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากให้ถี่ ๆ ทั่วผิวน้ำ หมุนจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอ ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวน้ำแห้งจึงวางแผ่นยาใช้ปากคีบ* (forceps) คีบแผ่นยา oxacillin วางบนจานเพาะเชื้อแล้วกดเบา ๆ เพื่อให้แนบสนิทกับผิวน้ำในจาน นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใน 15 นาทีหลังจากวางแผ่นยา โดยคว่ำหน้าจานเพาะเชื้อลง อ่านผลหลัง Incubate ไว้ 16-18 ชั่วโมง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone จากก้นจานเพาะเชื้อเป็น มิลลิเมตร ด้วยไม้บรรทัดหรือ caliper

* ก่อนใช้ forceps ต้อง sterile โดยแช่ใน 70% alcohol แล้วไปผ่านเปลวไฟ เมื่อ alcohol ถูกเผาไหม้ไปหมด รอสำครุให้เย็น จึงนำมาใช้คีบแผ่นยา

การแปลผล inhibition zone

เท่ากับหรือมากกว่า 13 มม. ให้อ่านว่าไวต่อ methicillin ถ้าอยู่ระหว่าง 11-12 มม. เป็น intermediate susceptible เท่ากับหรือน้อยกว่า 10 มม. เป็น resistant ตามหลักเกณฑ์ของ NCCLS (มาลัย วรจิตร, 2545)

3. การตรวจวิเคราะห์เชื้อแกรมลบ โดยวิธี spread plate method (Manual of Clinical Microbiology) หลังจาก incubate เชื้อบน MC ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูลักษณะโคโลนี ถ้าเชื้อไม่ขึ้นให้เพาะต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง เชื้อแกรมลบ จะย้อมติดสีแดง หลังจากนั้นทำการแยก (isolation) โคโลนีที่มีลักษณะต่างกันใส่ในอาหารเหลว brain heart infusion broth (BHI) นำไปอบ (incubate) ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงแล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี (Biochemical test)

Triple sugar iron (TSI) test

เป็นการทดสอบ จำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน โดยใช้ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส และซูโครส ทำให้ได้กรดและอาจให้ก๊าซ เป็นผลผลิตสุดท้าย นอกจากนี้ยังเป็นการทดสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ด้วย

วิธีการทดสอบ เช็ชเชื่อบนหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่เขี่ยเชื้อในคอนแรกลึกในประมาณ 2 ใน 3 ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

1. ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่าง ๆ

1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียว บนผิววุ้น (slant) ที่มีสีแดงส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) เป็นจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A

1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล แลคโตส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A/A

1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลชนิดใด ๆ เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N, K/N, K/K (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ, K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2. การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นเป็นฟองอากาศ

3. การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำของตะกอน เฟอรัสซัลไฟด์ อยู่ที่ก้น

Urease test

เป็นการทดสอบหาเอนไซม์ urease โดยดูผลการย่อยยูเรีย (urca) ให้ได้แอมโมเนีย ซึ่งทำให้ pH เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ คือ phenol red จากสีเหลืองเป็นสีแดง

วิธีการทดสอบ เช็ยเชื้อบนหน้าวุ้นของ urca agar slant ให้ทั่ว นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีชมพู

ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนสี

Citrate Test

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ Citrate เพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon Source) ได้หรือไม่ ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้เพียงอย่างเดียวได้จะเจริญและให้ alkaline product เกิดขึ้นซึ่งเป็นผลให้ indicator ใน medium ซึ่งได้แก่ bromthymol blue เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

วิธีการทดสอบ เช็ยเชื้อบนผิวของ simmon's citrate agar ให้ทั่ว นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : Medium เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : Medium ไม่เปลี่ยนสี (สีเขียว)

Indole test

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน Tryptohan เป็น Indole ได้หรือไม่ Tryptohan เป็น Amino Acid ชนิดหนึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Peptone Casein

วิธีการทดสอบ เช็ยเชื้อและแทง (stab) ปลายเข็มที่เช็ยเชื้อลึกในประมาณ 2 ใน 3 ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ SIM medium นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล โดยการหยด kovac's indole reagent 5 หยด เขย่าหลอดทดลองเบา ๆ สังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ medium

การอ่านผล

ผลบวก : มีสีแดงที่ผิวของ medium (red ring)

ผลลบ : สีเหมือน kovac's indole reagent คือสีเหลือง

Motile test

เป็นการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบ semisolid จึงดูการเคลื่อนที่ของเชื้อได้ จากการเคลื่อนที่ออกมากรวย stab ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

วิธีการทดสอบ ใช้หลอดที่ทดสอบ indole โดยอ่านผลก่อนหยด kovac's indole reagent

การอ่านผล

ผลบวก : ขุ่น

ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

Lysine test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อย lysine

Lysine decarboxylase (LDC) แบคทีเรียจะย่อยกลูโคส จนมีสภาพเป็นกรด เปลี่ยนสีของ indicator เป็นสีเหลือง หลังจากกลูโคสหมด เชื้อก็จะย่อย lysine แทน และถ้าเชื้อมีเอนไซม์ decarboxylase เชื้อจะ decarboxylate lysine และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง เปลี่ยนสี indicator เป็นสีม่วงเข้มเคม

Lysine deaminase (LDM) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีแดงที่ผิวหน้า เป็นลักษณะของเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม proteus ที่สามารถ deaminase lysine ให้ alpha - ketocarboxylic acid ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ferric ammonium citrate ที่มีอยู่ในอาหาร จะเกิดน้ำตาลแดงขึ้นบนผิวของอาหาร

วิธีการทดสอบ เชื้อเชื้อบนหน้าวุ้นของ lysine agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่เชื้อ เชื้อในคอนแรกกลิ้งในประมาณ 2 ใน 3 ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

Lysine decarboxylase (LDC)

ผลบวก : อาหารส่วนล่างมีสีม่วง

ผลลบ : อาหารส่วนล่างมีสีเหลือง

Lysine deaminase (LDM)

ผลบวก : ผิวหน้าอาหารมีสีแดง

ผลลบ : ผิวหน้าอาหารมีสีม่วง

Oxidase test

เป็นการตรวจหา cytochrom C-oxidase หรืออาจเรียกว่า indophenol oxidase โดย cytochrom C-oxidase จะเป็นตัว oxidize สารที่ใช้ทดสอบคือ 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (kovacs' oxidase reagent) จากสารไม่มีสีหรือสีม่วงอ่อน ให้ได้สีม่วงเข้ม

วิธีการทดสอบ ใช้ loop หรือ เข็มเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบขีดลงบน kovacs' oxidase paper สังเกตสีม่วงเข้มซึ่งจะเกิดภายใน 10 วินาที

การอ่านผล

ผลบวก : เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม ภายใน 5-10 วินาที

ผลลบ : เชื้อไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน โดยใช้เวลานานกว่า 10 วินาที

OF-glucose test

เป็นการดูความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาล glucose

วิธีการทดสอบ ใช้ เข็มเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ในหลอด OF-glucose นำไป incubate ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : ไม่เปลี่ยนสี (สีเขียวเหมือนเดิม)

ใน Mac Conkey agar ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกแต่แบคทีเรียแกรมลบแทงขึ้นได้ โดยแบคทีเรียพวกย่อยสลายน้ำตาล lactose จะให้โคโลนีสีชมพูเข้ม แบคทีเรียที่ไม่ย่อยน้ำตาล lactose จะให้โคโลนีไม่มีสี

Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำตาล lactose ได้แก่เชื้อ *K. pneumonia* จะมีลักษณะโคโลนีเป็นมูกและ *E. coli* ปฏิกริยาชีวเคมีสำหรับวินิจฉัยเชื้อคือ Triple iorn sugar (TSI).

lysine decarboxylase, urease, indole, citrate, H₂S, แก๊สจาก glucose และการเคลื่อนไหว ให้ผลดังนี้

Organism	TSI	Lysine	Urease	Citrate	Indole	Motility
<i>E. coli</i>	K/AGหรือA/AG, (H ₂ S)	+/-	-	-	+	+/-
<i>K. pneumonia</i>	A/AG	+/-	+	+	-	-

แบคทีเรียที่ไม่ย่อยสลายน้ำตาล lactose (non lactose ferment) ได้แก่เชื้อ *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ปฏิกริยาชีวเคมีที่ TSI โดยจะให้ผล K/K หลังจากนั้นพาไปทดสอบปฏิกริยา oxidase test

สำหรับเชื้อ *Acinetobacter baumannii* การทดสอบปฏิกริยาชีวเคมี จะให้ผลดังนี้

Organism	oxidase test	Growth at		OF glucose	Citrate
		37 °C	41 °C		
<i>A. baumannii</i>	-	+	+	+	+

P. aeruginosa ลักษณะโคโลนีแบนขอบไม่เรียบ มีกลิ่น grape like ของ aminoacetophenone ให้สารมีสีหลายชนิด เช่น pyocyanin ซึ่งมีสีน้ำเงิน และให้สาร pyoverdins ซึ่งมีสีเหลือง จึงมองเห็นโคโลนีเป็นสีเขียว บางสายพันธุ์อาจสังเคราะห์สาร pyorubin ซึ่งมีสีแดงและ pyomelanin ซึ่งมีสีน้ำตาลถึงดำ ทำให้ไปกลบสีน้ำเงินได้ ปฏิกริยาชีวเคมีให้ผลดังนี้

Organism	Oxidase	Cetrimide	Citrate	Pigment
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	Green-blue

การวิเคราะห์ ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แก่

- ค่าร้อยละ (%)
- ค่าเฉลี่ย (\bar{X})