คู่มือปฏิบัติการ

วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเห็ดราทางสัตวแพทย์

Laboratory manual of

veterinary bacteriology and mycology

อารินี ชัชวาลชลธีระ

วราภรณ์ ศุกลพงศ์

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

พิทยา ภาภิรมย์

อรุณี บุตรตาสี

วชิราภรณ์ กัมปนาวราวรรณ

หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิชีววิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2548

คำนำ

หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิทยาแบคทีเรียและวิทยาเห็ดรา จัดทำขึ้นเพื่อประกอบการเรียนวิชา 714 341 Vet. Bact & Myco สำหรับนักศึกษาสัตวแพทย์ ชั้นปีที่ 3 เนื้อหาส่วนใหญ่ได้ครอบคลุมวิธีการพื้นฐานที่ใช้กันโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางด้านจุลชีววิทยา เช่น ข้อควรระวังในการใช้ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์และเครื่องมือ วิธีการเก็บตัวอย่าง การตรวจพื้นฐาน วิธีการแยกพิสูจน์เชื้อแบคทีเรีย การทดสอบทางชีวเคมี การนับจำนวนโคโลนี การทดสอบความไวต่อยา และการแยกพิสูจน์เชื้อรา นอกจากนี้ยังได้รวบรวมรูปภาพต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวินิจฉัยเชื้อจุลชีพแสดงไว้เพื่อง่ายต่อความเข้าใจ คณะผู้เรียบเรียงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าหนังสือคู่มือปฏิบัติการเล่มนี้ จะช่วยให้นักศึกษาเข้าใจและสามารถทำการทดลองได้อย่างถูกต้องได้ผลตรงตามวัตถุประสงค์ของการเรียน

พฤษภาคม 2548

สารบัญ

หน้า

ปฏิบัติการที่ 1 ข้อควรระวังและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา 1

ปฏิบัติการที่ 2 การเก็บตัวอย่างเพื่อการส่งตรวจทางแบคทีเรีย 7

ปฏิบัติการที่ 3 การเพาะเลี้ยงและการย้อมสีแบคทีเรีย 10

ปฏิบัติการที่ 4 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี 21

ปฏิบัติการที่ 5 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม 36

ปฏิบัติการที่ 6 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างแท่ง 42

ปฏิบัติการที่ 7 กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ที่อาศัยในทางเดินอาหาร 45

ปฏิบัติการที่ 8 กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง ที่อาศัยนอกทางเดินอาหาร 49

ปฏิบัติการที่ 9 การวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะ 53

ปฏิบัติการที่ 10 การนับเซลล์ที่มีชีวิต 66

ปฏิบัติการที่ 11 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา 71

ปฏิบัติการที่ 12 การพิสูจน์ชนิดของยีสต์ 73

ปฏิบัติการที่ 13 การพิสูจน์เชื้อราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ 76

ปฏิบัติการที่ 14 การพิสูจน์เชื้อราด้วยตาเปล่า 79

ปฏิบัติการที่ 15 การศึกษาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจบางชนิด 80

คำถามท้ายบท 81

ภาคผนวกท้ายบท 82

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ตู้อบเพาะเชื้อ	3
รูปที่ 2 ตู้อบแห้งฆ่าเชื้อ	3
รูปที่ 3 เครื่องนึ่ง	4
รูปที่ 4 ตู้ปราศจากเชื้อ	4
รูปที่ 5 ตะเกียงบุนเสน	5
รูปที่ 6 เข็มเขี่ยเชื้อ	5
รูปที่ 7 แสดงการทดสอบแคมป์	23
รูปที่ 8 ผลการทดสอบแคมป์	24
รูปที่ 9 แสดงวิธี streak และ stab เชื้อลงใน TSI	31
รูปที่ 10 แสดงการทดสอบความไวต่อยา	63
รูปที่ 11 การนับเซลล์ที่มีชีวิต	67
รูปที่ 12 ภาพแสดงลักษณะเชื้อราชนิดต่าง ๆทางกล้องจุลทรรศน์	84 - 97

ปฏิบัติการที่ 1
ข้อควรระวังและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
(Precaution and equipments in microbiological laboratory)

พิทยา ภาภิรมย์
วชิราภรณ์ กัมปนาวราวรณ

ข้อควรระวังในการเรียนปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์

นักศึกษาต้องพึงระวังไว้เสมอว่า เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการเรียนปฏิบัติการบางชนิดไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัสสามารถก่อโรคในคนได้ การติดเชื้อเหล่านี้เกิดขึ้นได้หลายทางเช่น ทางผิวหนังจากการสัมผัสเชื้อโดยตรงหรือเกิดอุบัติเหตุจากของมีคมในห้องปฏิบัติการที่มแทง การติดต่อทางลมหายใจจากการสูดดมละอองเชื้อ และทางปากจากการปนเปื้อนไปกับอาหาร ฉะนั้นนักศึกษาต้องทำการทดลองด้วยความระมัดระวังโดยการให้ความร่วมมือปฏิบัติตามระเบียบและข้อบังคับในการใช้ห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัดดังต่อไปนี้

1. ทบทวนและทำความเข้าใจกับบทปฏิบัติการก่อนเข้าเรียนทุกครั้ง
2. ห้ามสูบบุหรี่และนำอาหาร ตลอดจนเครื่องดื่มทุกชนิดเข้ามาในห้องปฏิบัติการ
3. ทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนและหลังการทดลอง
4. ห้ามวางกระเป๋าเรียนหรืออุปกรณ์อื่นใดนอกเหนือจากการใช้ทดลองบนโต๊ะปฏิบัติการ
5. นักศึกษาที่ไว้ผมยาวต้องมัดรวบผมให้เรียบร้อย
6. ห้ามใช้ปากดูดสารละลาย ควรใช้ลูกยางหรือเครื่องช่วยดูดสารละลายสำหรับดูดสารละลาย
7. ในกรณีที่เชื้อหกหรือภาชนะบรรจุตัวอย่างแตก ให้เทราดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาทีก่อนเช็ดทำความสะอาด และแจ้งให้อาจารย์หรือเจ้าหน้าที่ทราบ
8. อุปกรณ์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อโรคเช่น สไลด์แก้ว ไม้พันสำลี และปิเปตต์ หลังการใช้งานให้แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ให้
9. ห้ามหยอกล้อหรือทำการทดลองใด ๆนอกเหนือบทปฏิบัติการในการเรียนโดยเด็ดขาด
10. เมื่อมีปัญหาใด ๆเกิดขึ้นระหว่างทำการทดลองควรสอบถาม ปรึกษาอาจารย์หรือเจ้าหน้าที่ที่ควบคุมการเรียนปฏิบัติการ
11. ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนและหลังเรียนปฏิบัติการ
12. ก่อนออกจากห้องปฏิบัติการปิดก๊าซ น้ำ และไฟฟ้าให้เรียบร้อย

อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

1. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

กล้องจุลทรรศน์เป็นอุปกรณ์จำเป็นขั้นพื้นฐานในงานทางจุลชีววิทยา เนื่องจากเชื้อจุลชีพมีขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า กล้องจุลทรรศน์เป็นอุปกรณ์ที่ช่วยในการศึกษารูปร่าง ขนาด และลักษณะการติดสีของจุลชีพเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อในเบื้องต้น หลักการทำงานโดยทั่วไปคือการขยายขนาดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ในส่วนของรายละเอียดอื่น ๆอาจแตกต่างกันไปแล้วแต่ลักษณะและวัตถุประสงค์การใช้งานเช่น กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดาชนิดสองตา (Compound light microscope) มีกำลังขยายอยู่ระหว่าง 40 – 1,000 เท่า มีใช้อยู่โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope) ใช้ศึกษาปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาในตัวอย่างโดยมีสารเรืองแสงช่วยในการตรวจจับ กล้องจุลทรรศน์ที่แสดงรายละเอียดเปรียบเทียบ (Phase contrast microscope) เป็นกล้องที่สามารถมองเห็นตัวอย่างในลักษณะสามมิติได้ และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscope) มีการพัฒนากำลังขยายให้สูงขึ้นหลายเท่าโดยการใช้สนามแม่เหล็กไฟฟ้าทำหน้าที่เป็นเลนส์แทนแก้ว การใช้กล้องจุลทรรศน์ในการเรียนปฏิบัติการ นักศึกษาต้องทำความเข้าใจเกี่ยวกับอุปกรณ์และหน้าที่ของแต่ละส่วน เพื่อการใช้งานที่มีประสิทธิภาพ ยืดอายุการใช้งาน และป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการใช้งานดังนี้

ส่วนประกอบและการใช้งานของกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงไฟธรรมดาชนิดสองตา

1.1 Ocular lens หรือเลนส์ตา ส่วนใหญ่มีสองข้างมีกำลังขยาย 10 เท่า สามารถเลื่อนเข้าออกได้ตามระยะห่างของตาและหมุนปรับความคมชัดได้ที่กระบอกเลนส์ ภายในมีเข็มชี้ (pointer) สำหรับบอกตำแหน่ง

1.2 Objective lens หรือเลนส์วัตถุ โดยทั่วไปมีกำลังขยายหลายขนาดตั้งแต่ 4 – 100 เท่า เมื่อประกอบกับเลนส์ตาซึ่งมีกำลังขยาย 10 เท่า กล้องจึงมีกำลังขยายรวม 40 – 1,000 เท่า เลนส์วัตถุเป็นชิ้นส่วนที่มีความสำคัญและราคาแพงที่สุดของตัวกล้องทั้งหมด การใช้งานควรดูตัวอย่างจากกำลังขยายต่ำสุดก่อนเพื่อปรับความคมชัดหรือโฟกัส (focus) จากนั้นจึงเปลี่ยนไปที่กำลังขยายสูงขึ้น การใช้กำลังขยายสูงสุด (X100) ต้องหยดน้ำมัน (oil) ลงบนตัวอย่างเพื่อลดการหักเหของแสงเข้าสู่เลนสซึ่งจะช่วยให้ภาพคมชัดยิ่งขึ้น หลังการใช้งานต้องทำความสะอาดเลนส์ด้วยน้ำยาทำความสะอาดเลนส์และใช้กระดาษเช็ดเลนส์เช็ดเท่านั้น ห้ามใช้ผ้าก็อซหรือวัสดุอื่นใดเช็ดโดยเด็ดขาดเพราะจะทำให้เกิดรอยขูดขีดบนเลนส์

1.3 Stage เป็นแผ่นรองใต้เลนส์ใช้สำหรับวางสไลด์แก้วที่มีตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ส่วนประกอบนี้สามารถปรับขึ้นลงได้โดยปุ่ม adjustment ที่อยู่ข้างตัวกล้อง ในการปรับขึ้นลงต้องระวังไม่ให้แผ่นสไลด์กระทบกับเลนส์เพราะจะทำให้เลนส์ชำรุดเสียหายได้

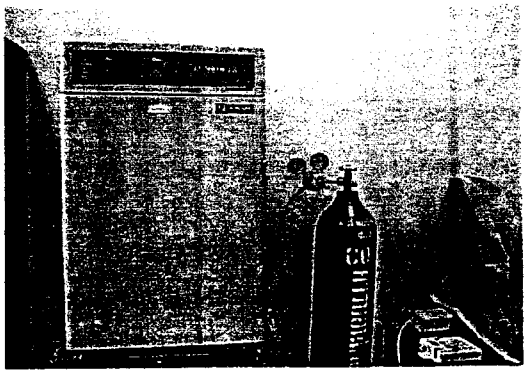
1.4 Condenser อยู่ใต้ stage มีเลนส์สำหรับโฟกัสแสงผ่านตัวอย่างไปยังเลนส์วัตถุ ภายในมี diaphragm เพื่อปรับหรี่แสง

1.5 Light source เป็นแหล่งกำเนิดแสง ปกติไส้หลอดทำด้วยทังสเตน หลังใช้งานควรปิดไฟให้เรียบร้อยเพื่อยืดอายุการใช้งาน

1.6 Cause และ Fine adjustment อยู่ด้านข้างของตัวกล้องทำหน้าที่ปรับความคมชัดของกล้อง โดยการปรับเลื่อน stage ขึ้นลง ปุ่มปรับหยาบจะอยู่ด้านนอกและมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนปุ่มปรับละเอียดจะอยู่ตรงกลาง

2. **ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)**

ตู้อบเพาะเชื้อเป็นตู้ปรับอุณหภูมิสำหรับเพาะและเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยปกติจะตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไป บางชนิดสามารถปรับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ภายในตู้ได้

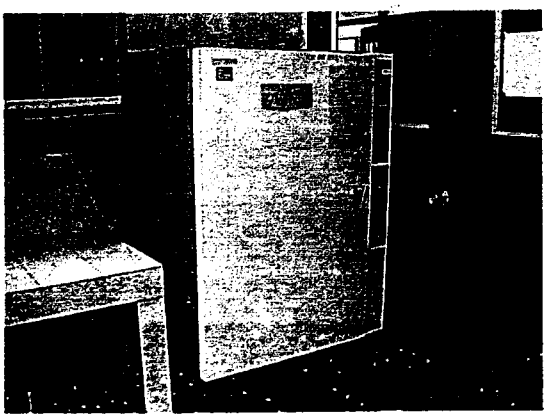


รูปที่ 1 ตู้อบเพาะเชื้อ

3. **ตู้อบแห้งฆ่าเชื้อ (Hot air oven)**

เป็นตู้อบอุณหภูมิสูงชนิดใช้อากาศส่งผ่านความร้อน ห้ามใช้กับวัสดุที่ไม่ทนร้อน เช่นพวกพลาสติก หรือเครื่องแก้วบางชนิด ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้แตกต่างกันไปโดยข้อกำหนดของ UK department of health (DHSS,1980) ได้แนะนำไว้ดังนี้

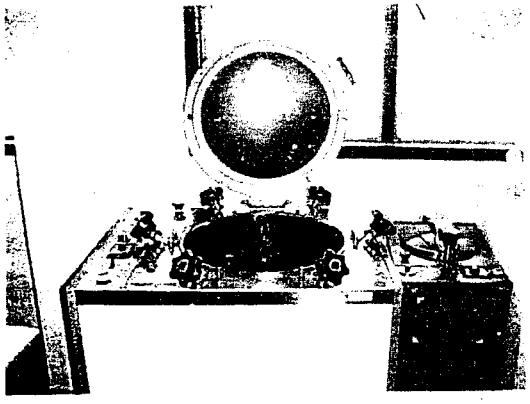
อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
160	45
170	18
180	7.5
190	1.5



รูปที่ 2 ตู้อบแห้งฆ่าเชื้อ

4. **เครื่องนึ่ง (Autoclave)**

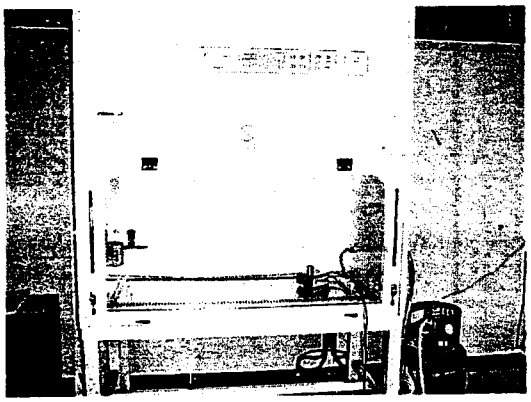
เป็นอุปกรณ์นึ่งฆ่าเชื้อจุลชีพแบบความร้อนชื้นภายใต้ความดัน ปกติใช้อุณหภูมิในการนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นในกรณีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่มีส่วนผสมของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบจะใช้อุณหภูมิที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้ความดันเท่าเดิม



รูปที่ 3 เครื่องนึ่ง

5. **ตู้ปราศจากเชื้อ (Safety cabinet)**

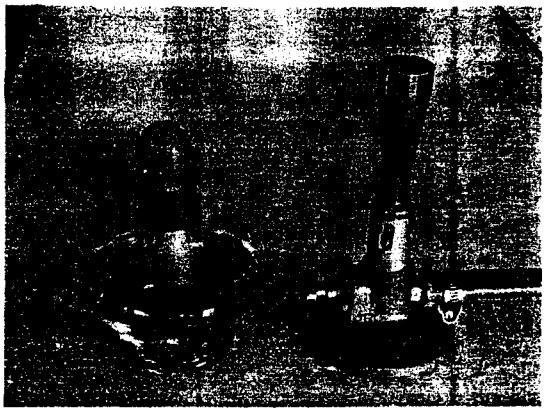
เป็นตู้ดูดอากาศ ด้านหน้าทำด้วยวัสดุโปร่งใสสามารถมองเห็นภายในตู้ขณะปฏิบัติงาน ปกติมีหลอดแสงยูวีไว้สำหรับฆ่าเชื้อ บางชนิดมีระบบกรองอากาศหลาย ๆชั้น (Laminar flow cabinet) ถ้าเป็นชนิดที่ดีที่สุดจะเป็นตู้ระบบปิดสามารถกรองอากาศทั้งเข้าและออกจากตู้ ป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอกเข้าสู่ตู้และป้องกันเชื้อโรคกระจายออกจากตู้ นอกจากนั้นยังมีถุงมือยาวติดตั้งกับตู้โดยตรงป้องกันการสัมผัสเชื้อของผู้ปฏิบัติงาน



รูปที่ 4 ตู้ปราศจากเชื้อ

6. **ตะเกียงบุนเสน (bunsenburner)**

เดิมใช้น้ำมันหรือแอลกอฮอลเป็นเชื้อเพลิง ปัจจุบันนิยมใช้ก๊าซโพรเพน (propane) เนื่องจากมีความสะดวกและให้เปลวไฟที่มีความร้อนสูงกว่า

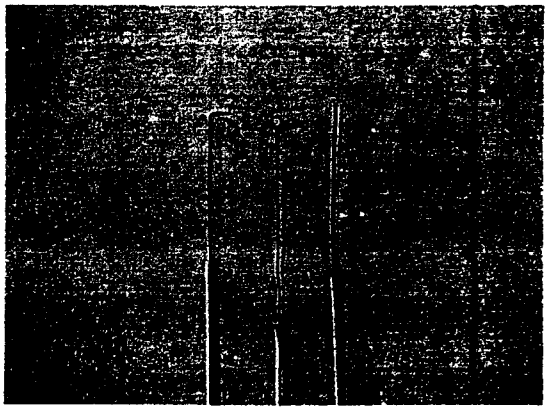


รูปที่ 5 ตะเกียงบุนเสน

7. **เข็มเขี่ยเชื้อ**

มี 3 ชนิด ชนิดปลายมน (loop) ที่บริเวณปลายจะเป็นวงมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. ชนิดปลายตรง (straight wire หรือ needle) ปลายจะเป็นเส้นตรง ส่วนชนิดที่ใช้สำหรับเขี่ยเชื้อราจะมีปลายหักงอเป็นมุม 90 องศา ลวดทั้งสามชนิดส่วนมากทำมาจากลวดนิโครม เป็นอุปกรณ์สำหรับเขี่ยป้ายเชื้อเพื่อย้อมสี ทำการทดสอบ หรือป้ายเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้ออื่น (inoculate)

ข้อควรจำ ก่อนและหลังใช้ต้องลนบนเปลวไฟจนแดงร้อนก่อนทุกครั้ง โดยค่อย ๆ ลนจากด้านโคนไปด้านปลายห้ามเผาเชื้อโดยตรงเพราะเชื้อบางส่วนที่ยังไม่ถูกเผาจะกระเด็นฟุ้งกระจายลงบนพื้น



รูปที่ 6 เข็มเขี่ยเชื้อ

8. **เครื่องแก้ว, อุปกรณ์พลาสติก และอุปกรณ์อื่น ๆ**

- จานเพาะเชื้อ (petri dishes) ใช้เพาะและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์หรือทำการทดสอบทางชีวเคมี โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดทั่วไปและจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเช่น blood agar, MacConkey agar และ Muller-Hinton agar เป็นต้น
- หลอดทดลอง (test tube) ใช้บรรจุอาหารเพาะเชื้อเพื่อทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นยังใช้เพาะเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อก่อนนำไปทดสอบความไวต่อยา และใช้ใส่อาหารเพาะเชื้อเพื่อการส่งตรวจ (transport media)
- พาสเจอร์ ปิเปตต์ (Pasteur pipette) เป็นปิเปตต์ปลายยาวโดยใช้จุกยางเป็นส่วนบังคับในการดูดปล่อยสารละลาย หรือใช้หยดปล่อยสารละลาย
- ปิเปตต์บอกปริมาตร (graduate pipette หรือ serological pipette) เป็นปิเปตต์ที่มีขีดบอกปริมาตรที่แน่นอน สามารถดูดปล่อยสารละลายตามปริมาตรที่ต้องการได้
- ปิเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipette) เป็นปิเปตต์ที่สามารถเปลี่ยนปลาย (tip) ได้ มีความสะดวกรวดเร็วในการใช้งาน บางชนิดสามารถปรับปริมาตรได้ตามต้องการ
- ไม้พันสำลี (cotton swab) เป็นอุปกรณ์สำหรับป้ายสิ่งส่งตรวจเพื่อส่งชันสูตร และขีดกวาด (streak) เชื้อในการทดสอบความไวต่อยา
- อุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาได้แก่ ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (rack), สไลด์แก้ว (glass slide) , กระจกปิดสไลด์ (cover glass) , กรรไกรและ คีมคีบ (forceps) เป็นต้น

บรรณานุกรม

Collins, C.H., Lyne, M. P and Grange, M.J. 1989. Microbiological Methods. 6 th ed. Butterworths London: 409 p.

Pratt, W.P. 1997. Laboratory Procedures Foe Veterinary Technicians. 3 nd ed. Mosby Missouri: 660 p.

Sirois, M. 1995. Veterinary Clinical Laboratory Procedures. Mosby Missouri: 160 p.

ปฏิบัติการที่2
การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางแบคทีเรีย

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจนั้นมีหลากหลายวิธี ขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง การเก็บรักษา วัตถุประสงค์ของการตรวจ และห้องปฏิบัติการที่เป็นผู้วินิจฉัยตัวอย่างนั้น ไม่ว่าจะเก็บด้วยวิธีใด ตัวอย่างที่ส่งมา ต้องมีรายละเอียดของประวัติสัตว์ เจ้าของตัวอย่างเช่น อายุ เพศ พันธุ์ น้ำหนัก การเลี้ยง ระยะเวลาที่เริ่มป่วย หรือตาย ความรุนแรงในฝูง รอยโรค อาการ การรักษา รวมทั้งการวินิจฉัยเบื้องต้น ต้องแนบมาพร้อมกับตัวอย่างที่ส่งด้วย เพื่อให้ทางห้องปฏิบัติการจัดการกับตัวอย่างได้ถูกต้องเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของผู้ส่ง

การเลือกตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างจากสัตว์ที่มีชีวิตหรือที่เพิ่งเสียชีวิต หากตายนานกว่า 3 ชม. แบคทีเรียในทางเดินอาหารจะกระจายทั่วร่างกายทำให้ผลการเพาะเลี้ยงผิดพลาดได้
2. ตัวอย่างที่ได้เป็นรอยโรคที่เกิดขึ้นไม่นานหลังแสดงอาการ (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคไวรัสจะมีเชื้ออยู่มากในขณะที่แสดงอาการ) และเลือกเก็บตัวอย่างที่จำเพาะต่อโรคที่สงสัย แต่ถ้ายังไม่สามารถสรุปโรคได้ควรเก็บมาหลายตัวอย่างเพื่อช่วยในการวิเคราะห์
3. หากเป็นไปได้ ควรเก็บตัวอย่างทั้งจากสัตว์ป่วยและสัตว์ปกติที่เลี้ยงรวมกัน เพราะสัตว์ที่เลี้ยงรวมกันนี้อาจอยู่ในระยะแรกของการติดเชื้อซึ่งจะมีการปล่อยเชื้อออกสู่ภายนอกได้มาก
4. จุลชีพมักมีมากที่ขอบรอยโรค ดังนั้นเก็บตัวอย่างที่อยู่ขอบของวิการ โดยเก็บติดส่วนที่เป็นปกติด้วย
5. สัตว์ที่ถูกเก็บตัวอย่างต้องไม่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมาก่อน เพราะยาปฏิชีวนะจะกดการเจริญของเชื้อจุลชีพ
6. การเก็บโดยใช้ไม้พันสำลี (cotton swab) อาจได้เชื้อค่อนข้างน้อย ซึ่งเชื้ออาจตายไประหว่างการขนส่งได้ ดังนั้นควรเก็บตัวอย่างเชื้อให้ได้มาก เช่น เก็บชิ้นเนื้อขนาดประมาณ 4 ลูกบาศก์เมตร เก็บหนอง อุจจาระ หรือสิ่งขับหลั่งจำนวนหลายมิลลิลิตร
7. เลือกตัวอย่างที่สามารถส่งวินิจฉัยเพิ่มเติมที่ห้องปฏิบัติการอื่น เช่น serology, haematology, pathology และ clinical biochemistry ได้ จะช่วยให้การวินิจฉัยชัดเจนยิ่งขึ้น

การเก็บและการขนส่ง

1. ภาชนะที่เก็บตัวอย่างต้องผ่านการฆ่าเชื้อ มีปิดสนิท น้ำไม่สามารถเข้า-ออกได้ และรักษาความชื้นไม่ให้เชื้อตายในระหว่างขนส่ง โดยอาจใช้อาหารจำเพาะ เช่น transport medium ซึ่งช่วยรักษาความชื้นทำให้เชื้อไม่ตาย แต่จะไม่เจริญมากขึ้นกว่าเดิม
2. วิธีการเก็บต้องสอดคล้องกับโรคที่สงสัย เช่น การติดเชื้อ anaerobe ต้องใช้อุปกรณ์สำหรับ anaerobic bacteria เท่านั้น เพราะออกซิเจนจะทำเชื้อเหล่านี้ตาย

3. ปิดฉลากที่ภาชนะบอก ตัวอย่างว่าเป็นอะไร เก็บเมื่อไร จากสัตว์ชนิดไหนตัวไหน กรณีที่สงสัยโรคสัตว์สู่คน (Zoonosis) เช่น วัณโรค, โรคแท้งติดต่อ, tularemia และ avian chlamydiosis ควรแจ้งให้ทางห้องปฏิบัติการทราบด้วย
4. ส่งห้องปฏิบัติการโดยทันที แต่ถ้าไม่สามารถทำได้ ให้เก็บในถังน้ำแข็งหรือตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง (freeze) แล้วส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

ชิ้นเนื้อ

เก็บใส่ถุงพลาสติก หรือกระป๋องมีฝาปิด ชิ้นส่วนลำไส้ให้ผูกหัว และท้ายก่อนตัดเก็บและแยกเก็บไม่ให้สัมผัสกับชิ้นเนื้ออื่น กรณีที่ไม่มีรอยโรคชัดเจนให้เก็บชิ้นปอด, ตับ, ไต, ม้าม, ลำไส้ และต่อมน้ำเหลือง เลือกตัวอย่างที่ขอบวิการให้มีส่วนปกติติดมาด้วย ใส่กล่องโฟมหรือกระติกน้ำแข็งที่มีน้ำแข็งหรือน้ำแข็งแห้งบรรจุ อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส กรณีต้องการตรวจสมอง ให้แบ่งสมองตามยาว ชิ้นหนึ่งใส่ภาชนะแช่เย็นหรือแช่แข็งส่งตรวจเพาะเชื้อ อีกชิ้นหนึ่งใส่ใน 10% formalin (ห้ามแช่แข็ง) เพื่อตรวจทางจุลพยาธิ

Swab

นิยมใช้ในการเก็บตัวอย่างโรคติดเชื้อ ใช้คู่กับ nonnutritional transport medium โดยทั่วไปเป็นสำลีพันปลายไม้ผ่านการฆ่าเชื้อ ขนาดยาวประมาณ 5-6 นิ้ว ในกรณีที่เก็บจาก cervix สุกร, ม้า และวัว จะใช้ swab ที่ก้านเป็นลวดหุ้มด้วยยางยาวประมาณ 18-24 นิ้ว เมื่อป้ายตัวอย่างแล้วให้แทงปลายสำลีลงใน transport medium ปิดฝาหลอด transport medium แล้วส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด

นม

ใช้สำลีชุบ 70% alcohol เช็ดปลายหัวนมวัว บีบไล่น้ำนมออกเล็กน้อย แล้วใช้หลอดปลอดเชื้อฝาเกลียว เปิดหลอดเอียงให้เกือบขนานกับพื้น บีบให้น้ำนมลงในหลอด ห้ามให้หัวนม และมือผู้รีดสัมผัสหลอดเด็ดขาด ปิดฝาส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วส่งตรวจโดยเร็วที่สุด

อุจจาระ

เก็บโดยตรงจาก rectum ห้ามเก็บอุจจาระที่ตกพื้นแล้วเด็ดขาด เนื่องจากอาจมีเชื้อปนเปื้อนจากดิน ใส่ในภาชนะมีฝาปิด ส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วส่งตรวจโดยเร็วที่สุด

ปัสสาวะ

เก็บด้วยวิธีปลอดเชื้อไม่ว่าจะเป็น midstream voiding, catheterization หรือ cystocentesis แล้วส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากปัสสาวะมีสภาพที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย กรณีที่ส่งตรวจหา leptosira ด้วย Dark-field microscopy ใช้ 10% formalin จำนวน 1.5 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างปัสสาวะ 20 มิลลิลิตร

เลือด

การเพาะเชื้อจากเลือด ใช้ในกรณีที่สงสัยการเกิด bacteraemia ต้องเก็บตัวอย่างปลอดเชื้อ โกนขนและเช็ดบริเวณที่จะเก็บเลือดด้วย 70% alcohol ทิ้งให้ alcohol ละเหยให้หมด จึงเจาะเก็บเลือด 5-10 มิลลิลิตร จำนวน 3-4 ตัวอย่าง ใน 24 ชม. ตัวอย่างเลือดเก็บในภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือดโดยเฉพาะ (Haemoculture)

ตัวอย่างจากการแท้ง

1. เก็บลูกที่แท้งทั้งตัว หรือ fetal abomasal conntent, ปอด, ตับ และวิการบนตัวลูก
2. ชิ้นรก และ cotyledon
3. ถ้าไม่สามารถเก็บรกได้ ให้เก็บ uterine discharge
4. กรณีสงสัยการแท้งจาก leptospirosis ให้เก็บปัสสาวะจากตัวแม่มาด้วย
5. เก็บ serum จากแม่ช่วงที่แสดงอาการป่วย และหลังจากแสดงอาการป่วย (paired sera) มาตรวจทาง serology เพื่อค้นหาโรค
6. เก็บรก, cotyledon, วิการบนตัวลูก, ตับ และปอดของลูก ใส่ใน 10% formalin เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

การเก็บตัวอย่างกล่าวมา เป็นการเก็บตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาโดยทั่วไป อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บ อุปกรณ์ที่ใช้เก็บ วิธีการตรวจและตัวอย่างที่ใช้ตรวจในบางห้องปฏิบัติการอาจแตกต่างออกไป ทั้งนี้ก่อนที่สัตวแพทย์จะส่งตรวจต้องทราบถึงความสามารถของห้องปฏิบัติการนั้นด้วยว่า สามารถตรวจวินิจฉัยโรค ด้วยวิธีอะไร ใช้เวลาเท่าไร เพื่อให้การวินิจฉัยโรคเป็นไปด้วยความรวดเร็ว และตรงกับวัตถุประสงค์ของสัตวแพทย์ผู้ส่งตรวจนั้น

บรรณานุกรม

Carter, G.R., Chengappa, M.M., and Robert, A.W. 1995. **Essential of Veterinary Microbiology, 5th edition**. William and Wilkings. USA. 394 p.

Hirsh, D.C. and Zee, Y.H. 1999. **Veterinary Microbiology**. Blackwell Science, Inc. USA. 479 p.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. 1997. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby-Year Book. Spain. 688 p.

ปฏิบัติการที่ 3
การเพาะเลี้ยง และการย้อมสีแบคทีเรีย
(Bacterial Culture and Staining)

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา
อรุณี บุตรตาสี

การย้อมสีแบคทีเรีย

การตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อหาสาเหตุของโรคแบคทีเรียนั้น จำเป็นจะต้องดูลักษณะรูปร่างแบคทีเรีย โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ช่วยขยาย แต่ตามธรรมชาติแล้วเชื้อแบคทีเรียจะมีลักษณะโปร่งแสง ซึ่งทำให้การศึกษาดูรายละเอียดต่าง ๆ ทำได้ยาก วิธีที่จะช่วยให้เห็นส่วนประกอบหรือรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียได้ชัดเจนนั้นก็คือ การย้อมสี (Staining)

การย้อมสีแบคทีเรีย แบ่งออกได้เป็น 4 วิธี ด้วยกันคือ

1. **การย้อมสีชนิดเดียว (Simple stain)** เป็นการย้อมสีเชื้อแบคทีเรียด้วยสีใดสีหนึ่งเพียงชนิดเดียว โดยเลือกใช้สีเบสิก (Basic dyes) เช่น Methylene blue, Crystal violet หรือ Safranin ฯลฯ ตัวเชื้อจะติดสีตามชนิดของสีย้อมเพียงสีเดียว การย้อมด้วยวิธีนี้ ต้องการศึกษา รูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย

2. **การย้อมสีให้ได้สีแตกต่างกัน (Differential stain)** เป็นการย้อมสีที่ใช้สีมากกว่า 1 สี โดยอาศัยน้ำยาล้างสี (Decolorizer) ร่วมด้วย ที่นิยมใช้กันคือ การย้อมสีแกรม (Gram staining) โดยสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะการติดสีแกรมออกเป็น 2 จำพวก คือ แกรมบวก และแกรมลบ

3. **การย้อมแบบเชื้อไม่ติดสี (Negative stain)** การย้อมสีวิธีนี้ตัวเซลล์ของแบคทีเรียจะไม่ติดสี แต่พื้นสไลด์จะติดสีทึบหรือดำเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์จะใสไม่มีสีบนพื้น สีดำทำให้มองเห็นรูปร่าง การเรียงตัว และขนาดของแบคทีเรียได้ชัดเจน และวิธีนี้ไม่มีการ fix ด้วยความร้อน ดังนั้นขนาดของแบคทีเรียที่เห็นจึงใกล้เคียงขนาดจริง สีที่นิยมใช้ในการย้อมได้แก่ indian ink และ nigrosin

5. **การย้อมสีพิเศษ (Special stain)** เป็นวิการย้อมโดยเฉพาะเจาะจงเพื่อศึกษารูปร่าง ลักษณะบางอย่างของเชื้อ เช่น การย้อมสีแฟลกเจลลา (Flagella stain) การย้อมแคปซูล (Capsule stain) เป็นต้น หรือเชื้อบางชนิดย้อมสีธรรมดาไม่ได้ เช่น เชื้อสไปโรชีต (Spirochete) จะต้องย้อมด้วย Silver impregnation stain

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษารูปร่าง โครงสร้าง หรือคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย จำเป็นต้องนำเชื้อแบคทีเรียนั้นมาเพิ่มจำนวนโดยการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture media) ให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ศึกษาในสิ่งที่ต้องการจะทราบได้โดยสะดวก

อาหารที่นิยมใช้เลี้ยงจุลินทรีย์

แบ่งตามลักษณะอาหาร มี 2 แบบ คือ

1. อาหารชนิดเหลว (liquid หรือ broth media) ซึ่งไม่มีส่วนผสมของวุ้นปนอยู่ นิยมบรรจุในหลอดทดลองหรือปิดด้วยจุกเกลียว

2. อาหารชนิดแข็ง (solid media) ซึ่งจะมีส่วนผสมของวุ้นปนอยู่ด้วย นิยมบรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเรียก agar plate เพื่อไว้ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียหรือบรรจุในหลอดแก้วทดลอง โดยเอียงหลอดทดลอง เมื่ออาหารแข็งตัวแล้วจะได้พื้นหน้าเอียงของอาหารเรียก agar slant เพื่อไว้ใช้แยกเชื้อและเก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบ่งตามวัตถุประสงค์การใช้ มี 5 แบบคือ

1. **Chemical defined media** อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบปริมาณแท้จริงของสารแต่ละชนิดที่มีอยู่ นิยมใช้ในการทดลองเฉพาะจุดประสงค์ มักไม่ใช้ในห้องปฏิบัติการชันสูตรทั่วไป

2. **Basic nutritive media** อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทั่วไป เช่น Nutrient agar

3. **Enriched media** อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเสริมเพียงพอ ที่จะให้เชื้อที่เจริญเติบโตยากสามารถเจริญได้ เช่น Blood agar, Egg Yolk agar

4. **Selective media** อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อแบคทีเรียบางกลุ่มหรือบางชนิด โดยมีสารยับยั้งไม่ให้เชื้อไม่ต้องการเจริญขึ้นได้ เช่น Brilliant green agar, McConkey agar

5. **Indicator media** อาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยในการวินิจฉัยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ที่เกิดขึ้น มักจะผสมน้ำตาลและมี pH indicator ที่จะให้สีแตกต่างกัน เช่น McConkey agar, XLD agar, Edwards medium ใน Blood agar เองก็มีคุณสมบัตินี้โดยใช้การเกิด Hemoysis เป็น indicator

ปฏิบัติการที่ 3.1 การย้อมสีแกรม (Gram's staining)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษา ศึกษาถึงลักษณะเทคนิคและขั้นตอนการย้อมสีแกรม
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างการติดสีระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Streptococcus* spp.
3. *Escherichia coli*
4. *Bacillus cereus*

วัสดุและอุปกรณ์

1. สไลด์แก้ว และน้ำเกลือ
2. Crystal violet solution
3. Gram iodine solution
4. 95% ethanol
5. Safranin solution
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. loop และ straight wire
8. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. สเมียร์เชื้อ *S. aureus, Streptococcus* spp., *E.coli, B. cereus* ลงบนน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ ให้อยู่ห่างกันพอประมาณ ทิ้งให้แห้งในอากาศ
2. นำไปตรึงด้วยเปลวไฟ เป็นการตรึงเชื้อแบคทีเรียด้วยความร้อน (heat fix) โดยใช้ด้านล่างของแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง โดยปล่อยให้ร้อนพอที่จะแตะฝ่ามือได้
3. หยดสี Crystal violet solution ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบา ๆ
4. ย้อมทับด้วย Gram iodine solution ให้ท่วมนาน 1 นาที เทสีทิ้ง และล้างออกด้วยน้ำประปาอีกครั้ง
5. ใช้ 95% alcohol ฟอกสี โดยหยดให้ไหลไปช้า ๆ ตามสไลด์จนดูไม่มีสีหลุดออกมา (ประมาณ 5-10 วินาที) ล้างด้วยน้ำอีกครั้ง
6. ย้อมทับด้วย Safranin solution ทิ้งไว้นาน 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบา ๆ ซับด้วยกระดาษให้แห้ง
7. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนต์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

ปฏิบัติการที่ 3.2 การย้อมสีแคปซูลของแบคทีเรีย (Capsule staining)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการย้อมแคปซูลของแบคทีเรีย

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Klebsiella* spp.
2. *Escherichia coli*

วัสดุและอุปกรณ์

1. สไลด์แก้ว และน้ำเกลือ
2. loop และ straight wire
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. สี Basic fuchsin หรือ Crystal violet
5. สีคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการปฏิบัติการ

1. สเมียร์เชื้อทั้งสองลงบนหยดน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ
2. นำไปตรึงด้วยเปลวไฟ โดยผ่านเปลวไป 2-3 ครั้ง
3. หยดสี Basic fuchsin หรือ Crystal violet ให้ท่วม แล้วใช้ไฟลนใต้สไลด์ จนสีกลายเป็นไอ เทสีทิ้ง
4. ล้างด้วย $CuSO_4$ เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบา ๆ ซับให้แห้งตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ปฏิบัติการที่ 3.3 การย้อมสีเมธิลีนบลู (Methylene blue staining)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการย้อมแบบ Methylene blue staining

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Bacillus cereus*

วัสดุและอุปกรณ์

1. สไลด์แก้ว และน้ำเกลือ
2. loop และ straight wire

3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. Methylene blue solution
5. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการปฏิบัติการ

1. สเมียร์เชื้อทั้งสองลงบนหยอดน้ำเกลือบนสไลด์แก้ว ปล่อยให้แห้งในอากาศ
2. นำไปตรึงด้วยเปลวไฟ โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
3. หยด Methylene blue solution ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบา ๆ
4. ซับให้แห้ง แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

บทปฏิบัติการที่ 3.4 การย้อมสีแบคทีเรียแบบ Acid-fast (Acid-fast staining)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการย้อมแบบ Acid-fast staining
2. เพื่อศึกษาการติดสีของแบคทีเรียกลุ่ม Acid-fast bacteria

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Nocardia* spp.
2. *Staphylococcus aureus*

วัสดุและอุปกรณ์

1. สไลด์แก้ว และน้ำเกลือ
2. loop และ straight wire
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. Carbonfuchsin
5. Acid alcohol
6. Methylene blue
7. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. สเมียร์เชื้อทั้งสองลงบนหยดน้ำเกลือบนสไลด์แก้ว แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ
2. นำไปตรึงด้วยเปลวไฟ โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
3. หยด Carbon fuchsin ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 30-60 วินาที ใช้ไฟลนใต้สไลด์จนสี carbon fuchsin เป็นไอขึ้น (ระวังอย่าให้เดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที (ถ้าสีแห้งให้เติมสีแล้วลนไฟใหม่) หลังจากนั้นเทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำประปา
4. ล้างสีด้วย acid alcohol โดยราดทับให้ท่วมสไลด์ นานประมาณ 1-2 นาที จะได้สเมียร์ใสหรือสีชมพูเรื่อ ๆ แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา

5. หยด Methylene blue ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้นาน 15-20 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปา แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า (หัว oil)

บทปฏิบัติการที่ 3.5 การย้อมสี endospore

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการย้อมสี endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างเฉพาะอย่างของแบคทีเรีย
2. เพื่อทราบลักษณะโครงสร้างของ endospore จากกล้องจุลทรรศน์

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Bacillus cereus*
2. *Escherichia coli*

วัสดุและอุปกรณ์

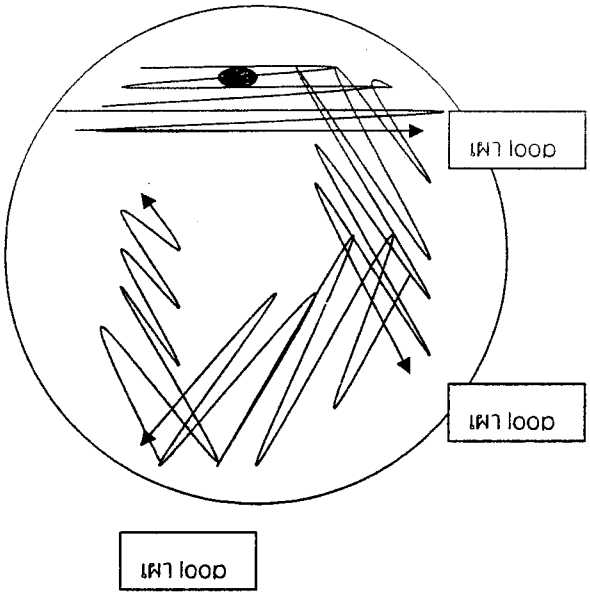
1. สไลด์แก้ว และน้ำเกลือ
2. loop และ straight wire
3. สี malachite green
4. สี safranin
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. สเมียร์เชื้อทั้งสองให้ห่างกันพอสมควร ทำให้แห้งในอากาศ
2. นำมาตรึงด้วยเปลวไฟ โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
3. หยด malachite green ให้ท่วมบริเวณที่สเมียร์ ใช้ไฟลนใต้สไลด์ นาน 5 นาที (ระวังอย่าให้เดือด คอยเติมสีให้ท่วมอย่าให้สีแห้งเมื่อยังไม่ครบเวลา)
4. ทิ้งสไลด์ให้เย็น แล้วล้างด้วยน้ำประปาผ่านเบา ๆ
5. ย้อมทับด้วย safranin นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

บทปฏิบัติการที่ 3.6 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

1. ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการด้วย loop แล้ว streak ลง blood agar plate ดังรูป



2.เก็บเพาะบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง บันทึกผลลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น

ผลปฏิบัติการที่ 3

วาดภาพ และระบายสีเซลล์ของแบคทีเรีย ที่ได้จากการย้อมชนิดต่าง ๆ

ปฏิบัติการที่ 3.1

Staphylococcus aureus ติดสีแกรม.....	*Streptococcus* spp. ติดสีแกรม.....
Bacillus spp. ติดสีแกรม.....	*Escherichia coli* ติดสีแกรม.....

ปฏิบัติการที่ 3.2

Klebseilla spp.	*Escherichia coli*

ปฏิบัติการที่ 3.3 การย้อม Methylene blue

Bacillus cereus	*Streptococcus* spp.

ปฏิบัติการที่ 3.4 การย้อม Acid-Fast

Nocardia spp.	*Staphylococcus aureus*

ปฏิบัติการที่ 3.5 การย้อม Endospore

Bacillus cereus	*Escherichia cili*

ปฏิบัติการที่ 3.6 ผลการเพาะเชื้อ

ชนิดของแบคทีเรีย	การเจริญบน blood agar

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 4
การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

การวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย โดยทั่วไปมักใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ทั้งจากการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อและผลผลิตที่เชื้อแต่ละชนิดสร้างขึ้น ร่วมกับผลการย้อมสีและรูปร่างเซลล์ จะช่วยให้แบ่งกลุ่มหรือแยกชนิดของแบคทีเรียได้

1. Catalase Test

หลักการ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ Catalase จะสามารถเปลี่ยน Hydrogen peroxide ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในขบวนการขนถ่ายอิเลคตรอน และเป็นพิษต่อเซลล์ ให้เป็นน้ำและออกซิเจน

วิธีทดสอบ

แตะโคโลนีของเชื้อที่ต้องการลงบนสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% hydrogen peroxide ลงบนเชื้อ หรือหยด 3% hydrogen peroxide บนกระจกจากนั้นจึงแตะเชื้อวางบนน้ำยา ขณะแตะเชื้อต้องระวังไม่ให้ติด blood agar มาด้วยเพราะจะทำให้เกิดผลฟองขนาดเล็ก ซึ่งเป็นผลบวกเทียม (false positive)

การแปลผล

ผลบวก มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

ผลลบ ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

2. Oxidase test

หลักการ

แบคทีเรียบางชนิดมีเอนไซม์ Cytochrome oxidase ช่วยกระตุ้น (activate) ปฏิกิริยา oxidase ของ Cytochrome โดย oxygen ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของขบวนการขนถ่ายอิเลคตรอน โดยออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวขนถ่ายอิเลคตรอน ทดสอบโดยใช้สารบางชนิด เช่น *p*-phenylene-diamine dihydrochloride ทำหน้าที่เป็นตัวแทนออกซิเจนในการรับอิเลคตรอนเมื่อถูก oxidize จะให้สีน้ำเงินเข้ม (indophenol blue)

วิธีทดสอบ

ป้ายเชื้อลงบนกระดาษที่ชุบน้ำยา ที่มี dimethyle-*p*-phenylene-diamine dihydrochloride

การแปลผล

ผลบวก มีสีน้ำเงินเข้ม เกิดขึ้นภายใน 5-10 วินาที

ผลลบ ไม่เกิดสี

3. Glucose Oxidation-Fermentation Test (OF - Glucose)

หลักการ

เพื่อทดสอบว่า แบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคสแบบหมักย่อย (fermentation) หรือใช้แบบออกซิไดซ์ (oxidation) หรือไม่ใช้น้ำตาลกลูโคสเลย ทั้งขบวนการการหมักย่อยและออกซิไดซ์ เมื่อแบคทีเรียมีการใช้กลูโคส จะเกิดกรด ซึ่งกรดจะไปเปลี่ยนสีของ indicator ในอาหารคือ bromocresol blue เป็นสีเหลือง แต่ถ้ามีด่างเกิดขึ้นจากการใช้ peptone แทนน้ำตาล อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน การทดสอบนี้สามารถใช้กับน้ำตาลตัวอื่นได้โดยใช้หลักการเดียวกัน และใช้ชื่อตามน้ำตาลที่ทดสอบ เช่น OF-Maltose , OF-Lactose

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อแทง (stab) ลงใน OF- glucose media จำนวน 2 หลอด ปิดผิวหน้าอาหารของหลอดหนึ่งด้วย liquid parafin หลอดนั้นจะอยู่ในสภาพ anaerobic แบคทีเรียต้องใช้น้ำตาลด้วยขบวนการหมัก (fermentation) เท่านั้น ส่วนอีกหลอดหนึ่งที่ไม่มี liquid parafin ปิด จะอยู่ในสภาพ aerobic เก็บบ่มใน incubatorที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ช.ม. แล้วอ่านผล

การแปลผล

Fermentation : มีสีเหลืองทั้ง 2หลอด

Oxidation : มีสีเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่มี liquid paraffin

Non-oxidizer หรือ Nonsaccharolytic หรือ Non-reaction : ทั้งสองหลอดยังคงมีสีเดิม หรือเป็นสีน้ำเงิน

4. Bile Esculin Hydrolysis

หลักการ

แบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดี (bile) และสามารถย่อย esculin ให้สาร esculatin ไปทำปฏิกิริยากับ ferric iron ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้สารสีดำหรือน้ำตาล

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี streak บนผิว agar เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ช.ม. แล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก มีสีดำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. Brilliant Green agar

หลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อมี lactose และ sucrose เป็นสารอาหารสำคัญ จุลชีพที่ใช้ น้ำตาลเหล่านี้ได้จะให้กรด ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ phenol red จะให้โคโลนีและอาหารเป็นสีเหลือง แต่ถ้าใช้น้ำตาลทั้งสองไม่ได้และใช้ peptone แทน จะให้ผลผลิตเป็นด่าง โคโลนีและอาหารเพาะเชื้อใต้โคโลนีเป็นสีแดง มักใช้ในการแยก *Salmonella* spp. ออกจากแบคทีเรียอื่น โดยมี brilliant green dye เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในทางอาหารชนิดอื่น

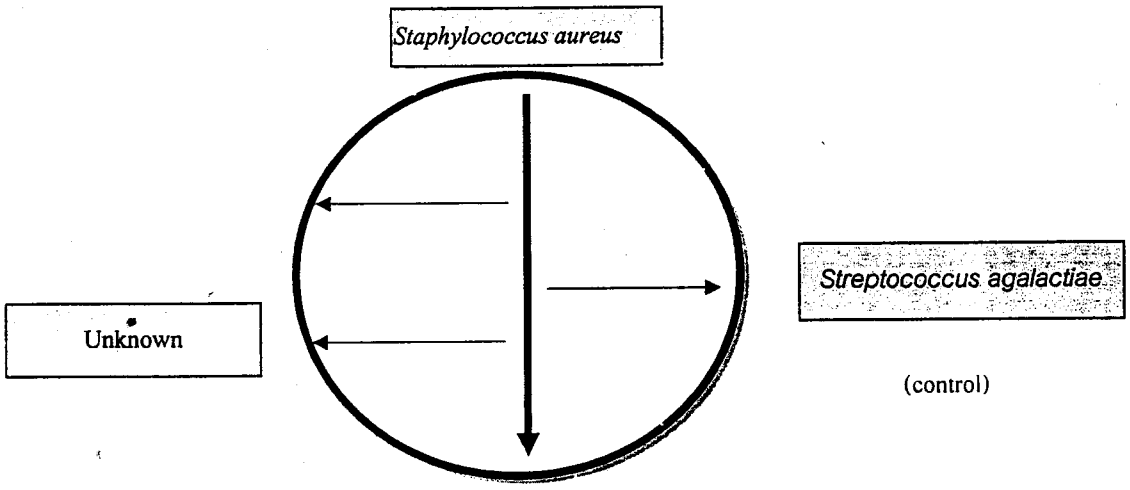
6. CAMP test

หลักการ

เป็นการทดสอบการสร้าง CAMP factor ซึ่งเป็น ceramide-binding protein ชนิดหนึ่ง พบได้ในจุลชีพหลายชนิด เช่น *Streptococcus agalactiae, Rhodococcus equi, Actinomyces pyogenes, Actinobacillus pleuro-pneuminiae* โดย CAMP factor จะเสริมฤทธิ์ของ sphingomyelinase ใน Staphylococci ช่วยให้เกิด Hemolysis แบบ incomplete ของ *Staphylococcus aureus* ที่ลากตั้งฉากกัน เกิดเป็น complete hemolysis ซึ่งรูปร่างของการเกิด complete hemolysis ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันในแต่ละจุลชีพ

วิธีทดสอบ

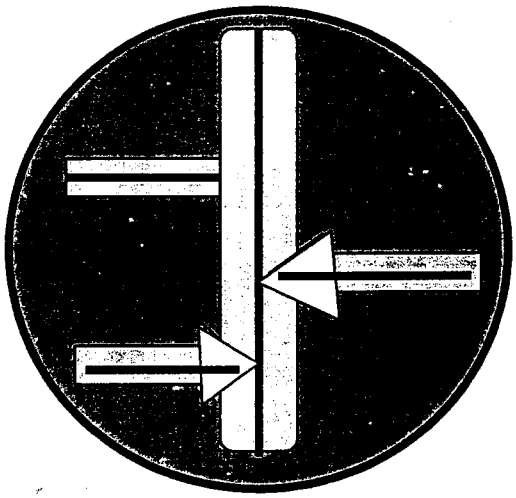
ใช้ sheep หรือ cow blood agar plate แตะเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลากผ่านกึ่งกลาง plate แแล้วแตะเชื้อ *Streptococcus agalactiae (หรือRhococcus equi, Actinomyces pyogenes Actinobacillus pleuraniae, Liateria monocytogenes*) ลากตั้งฉากกับรอย streak ของ *S. aureus* โดยให้ห่างประมาณ 0.3-0.5 ซม. ดังภาพ เข้าตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม.



รูปที่ 7 แสดงการทดสอบแคมป์

การแปลผล

จุลชีพ	รูปร่างของ complete hemolysis ที่ปลายของรอย Streak
Streptococcus agalactiae	หัวลูกศร (arrow-head)
Rhodococcus equi	รูปพลั่ว (shovel-shaped) และเกิดข้ามไปยังอีกด้านหนึ่งของรอย Streak
Corynebacterium renale	รูปสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ
Actinobacillus pyogenes	สามเหลี่ยมที่มีฐานขนานรอย Steak ของ *S. aureus*
Listeria monocytogenes	เกิด complete hemolysis ตลอดรอย steak ของ Listeria
Actinobacillus pleuraniae	รูปสี่เหลี่ยม ขนาดใหญ่



รูปที่ 8 แสดงผลการทดสอบแคมป์

7. Citrate test

หลักการ

แบคทีเรียบางชนิด สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งของคาร์บอน ในขบวนการ metabolism ได้ผลผลิตเป็นด่างซึ่งจะทำให้ indicator เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนีแล้ว streak บนผิวของอาหารเก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
ผลลบ	ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือไม่มีเชื้อเจริญ

8. Coagulase teat

หลักการ

coagulase เป็นเอนไซม์ ที่มีคุณสมบัติเหมือน prothrombin ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ plasma factor ให้สารเหมือน thrombin สามารถเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ทำให้ plasma แข็งตัว coagulase มี 2 ชนิด คือ free coagulase และ bound coagulase หรือ clumping factor

วิธีทดสอบ

ในการทดสอบ มี2 วิธี คือ

1. การทดสอบบนแผน slide (slide test) เป็นการทดสอบ enzyme bound coagulase ซึ่งติดกับผนังเซลล์ของเชื้อ ทดสอบโดยนำเชื้อมาผสมน้ำกลั่น หรือน้ำเกลือบน slide แล้วหยด plasma ลงไปผสมให้เข้ากัน ถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำให้เกิด fibrin ระหว่างตัวเชื้อ ทำให้เชื้อเกาะเป็นกลุ่มก้อนให้เห็น

2. การทดสอบในหลอดทดลอง (Tube test) เป็น การทดสอบ enzyme free coagulase ทดสอบโดยการ inoculate เชื้อลงในหลอดที่มีพลาสมาอยู่ เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18 – 24 ช . ม. แล้วอ่านผล ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ จะทำให้ plasma แข็งตัว

การแปลผล

ผลบวก	plasma แข็งตัวติดหลอดทดลองหรือเป็นก้อนกลิ้งไปมา
ผลลบ	plasmaไม่แข็งตัว

9. Eosin Methylene Blue agar (EMB agar)

หลักการ

อาหารมีน้ำตาล lactose และ saccharose เป็นองค์ประกอบสำคัญ และมี eosin และ methylene blue เป็น pH indicator ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งจะให้โคโลนีวาวแสง (metallic sheen) ชัดเจน

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนีแล้ว streak ถี่ ๆ บนผิวของอาหาร เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	โคโลนีเกิดสีเขียววาว (metallic sheen)
ผลลบ	ไม่เกิด metallic sheen

10. Gelatin liquefaction

หลักการ

แบคทีเรียที่สร้าง เอนไซม์ gelatinase ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารนั้นเหลว แม้จะแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้อาหารอีกหนึ่งหลอดไม่ต้องใส่เชื้อเป็นหลอดควบคุม เก็บทั้งสองหลอดในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม. จากนั้นนำไปแช่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที

การแปลผล

ผลบวก	อาหารในหลอดที่ใส่เชื้อเหลว
ผลลบ	อาหารในหลอดที่ใส่เชื้อ แข็งตัวเหมือนหลอดควบคุม

11. Indole test

หลักการ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ tryptophanase จะสามารถย่อย tryptophan ได้ indole, pyruvic acid และ ammonia indole ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ *p*-dimethylamine benzaldehyde ในน้ำยา Kovac ที่หยดลงไป ได้สีแดงเกิดขึ้น

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในปฏิบัติการนี้ใช้ MI medium (motility-indole test medium) เก็บในตู้เพาะบ่ม 37องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม. หลังจากนั้นหยดน้ำยา Kovac ลงไป แล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	เกิดสีแดงในชั้นของน้ำยาKovac ที่หยดลงไป
ผลลบ	ไม่เกิดสีแดงในชั้นของน้ำยา Kovac ที่หยดลงไป

12. Lysine Decarboxylase test

หลักการ

Decarboxylase เป็นเอนไซม์ที่ดึงเอาหมู่ carboxyl (-COOH) ออกจากกรดอะมิโน แล้วให้สารพวก amine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง decarboxylation จะเกิดขึ้นได้ดีในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและภาวะที่เป็นกรด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ enzyme decarboxylase มีน้ำตาลกลูโคสอยู่ในปริมาณน้อยมาก ขั้นแรกที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสได้ จะหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสได้กรดซึ่งเปลี่ยนสี indicator ให้เป็นสีเหลืองก่อน เมื่อเชื้อใช้กลูโคสหมดจะเปลี่ยนไปใช้อาหารอื่น โดยถ้าเชื้อนั้นมีเอนไซม์ decarboxylase ซึ่งจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่ใช้ทดสอบ เอนไซม์นั้นจะย่อยกรดอะมิโนให้เป็นสาร amine ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างทำให้สีของ indicator เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี streak และ stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในปฏิบัติการนี้ใช้ LD medium(Lysine decarboxylase และ lysine deaminase test medium) เก็บในตู้เพาะบ่ม 37องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วง
ผลลบ	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง

13. MacConkey agar

หลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Bile salt เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก(ส่วนใหญ่)และแกรมลบบางชนิด มี lactose เป็นตัวชี้ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดโดยมี Neutral red เป็น pH indicator ถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาล lactose ได้จะให้กรดซึ่งจะเปลี่ยนสี indicator เป็นสีชมพูที่โคโลนีและ agar แต่ถ้าใช้ไม่ได้จะไม่เกิดสี จุลชีพที่เจริญได้ดีมักอยู่ในกลุ่ม *Enterobacteroaceae*

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนีแล้ว streak ถี่ ๆ บนผิวของอาหาร เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24ช.ม.

การแปลผล

Lactose fermenter (LF)	:โคโลนีสีชมพู
Non-lactose fermenter (NLF)	:โคโลนีใสไม่มีสี

14. Malonate

หลักการ

แบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้ sodium malonate เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้และจะให้ผลผลิตเป็นด่างซึ่งจะทำให้ indicator เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน
ผลลบ	ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

15. Motility test

หลักการ

อาหารที่ใช้ทดสอบมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) ซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.4% หรือน้อยกว่า เชื้อที่เคลื่อนที่ได้จะเคลื่อนที่จากรอย stab เชื้อในอาหาร ทำให้เกิดความขุ่นตามรอยที่เชื้อเคลื่อนที่

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่าให้ถึงก้นหลอด ในปฏิบัติการนี้ใช้ MI medium (motility-indole medium) เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	เชื้อเจริญออกรอยแทง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น
ผลลบ	เชื้อเจริญรอย stab เท่านั้น เห็นรอย stab ชัดเจนอาหารใส

16. Methyl red test

หลักการ

แบคทีเรียที่สามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดออกมาหลายชนิดปนกัน และมีปริมาณมากพอจนระบบบัฟเฟอร์ในอาหาร ไม่สามารถรักษาความสมดุลย์ของความเป็นกรด-ด่างได้ ทำให้ pH ของอาหารลดลงต่ำกว่า 4.4 ภายหลังจากอบเพาะเชื้อนาน 48-72 ช.ม. เมื่อหยดน้ำยา methyl red ลงไปจะเกิดสีแดง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีทดสอบ

แตะจากเชื้อโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม. หลังจากนั้นหยดน้ำยา methyl red ลงไปแล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	มีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ผลลบ	มีสีเหลืองของน้ำที่หยดลงไป

17. 6.5%NaCl

หลักการ

ใช้ทดสอบแบคทีเรีบกลุ่ม Enterococci ที่อาศัยในลำไส้ ซึ่งจะทนต่อความเค็มและเจริญได้

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม

การแปลผล

ผลบวก	อาหารขุ่น มีการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ
ผลลบ	อาหารใสเช่นเดิม

18. Nitrate reduction test

หลักการ

เพื่อดูความสามารถของแบคทีเรียในการ reduce nitrate ให้เป็น nitrite หรือสารอื่น ๆเช่น ammonia, nitrogen, nitric oxide หรือ nitrous oxide nitrite ที่เกิดขึ้นสามารถทดสอบได้โดยการหยดน้ำยาที่มี napthylamine และsulfanilic acid ลงไป ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ nitrite ได้สาร *p*-sulfobenzyme-azo-d-napthylamine ซึ่งมีสี แดง

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่าให้ถึงก้นหลอด (ในปฏิบัติการนี้ใช้ motile-nitrate medium ซึ่งใช้ดูการใช้ nitrate และการเคลื่อนที่) เพาะบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24ช.ม. หลังจากนั้น หยดสารละลาย A ซึ่งมี napthyamine และ สารB ซึ่งมี sulfanilic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	กรณีที่ 1 มีสีแดงเกิดขึ้น
	กรณีที 2 ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น และเมื่อหยดผงสังกะสีแล้วก็ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น
ผลลบ	ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น เมื่อหยดผงกะสีแล้วจึงจะสีแดง

19. Phenylamine deaminase

หลักการ

แบคทีเรียที่เอนไซม์ phenylanine deaminase สามารถดึงหมู่อะมิโนจากกรดอะมิโน phenylanine ได้ กรด phenyl-pyruvic acid ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ ferric cholride ในน้ำยา 10% FeCl2 ที่หยดลงไปทดสอบ ได้สารสีเขียวเกิดขึ้น

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม. หลังจากนั้น หยด FeCl 2 ลงไป แล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	มีสีเขียวเกิดขึ้นที่หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
ผลลบ	ไม่มีสีเกิดขึ้น

20. PR- Mannitol, PR-Sorbitol

หลักการ

เป็นการทดสอบการใช้น้ำตาล Mannitol และ Sorbitol โดยมี Phenol red เป็น pH indicator เชื้อที่ใช้น้ำตาลได้จะได้กรด ซึ่ งไปเปลี่ยนสีของ indicator จากสีส้มแดง เป็นสีเหลือง นอกจาก mannitol และ sorbital แล้วสามารถใช้น้ำตาลชนิดอื่นได้

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อที่ต้องการทอสอบ stab ลงในอาหาร เก็บบ่มที่37 องศาเซลเซียส นาน 18-24ช.ม.แล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
ผลลบ	อาหารเป็นสีส้มเช่นเดิม

21. Purple Agar Base +1% maltose

หลักการ

Purple agar base เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Bromocresol purple เป็น pH indicator แบคทีเรียที่สามารถใช้ maltose ได้จะให้ผลผลิตที่เป็นกรด ทำให้เกิดสีเหลืองของ bromocrresol blue โดยถ้าใช้ maoltose ได้มาก จะเกิดการเปลี่ยนสีทั้งใน agar และโคโลนีของเชื้อ นิยมใช้ในการแยกวินิจฉัย *Staphylococcus aureus* กับ *Staphylococcus intermedius*

การแปลผล

+g	= ให้สีเหลืองของโคโลนีและ agar ใต้โคโลนี
+i	= ให้โคโลนีสีออกเขียว agar ใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง
ผลลบ	= โคโลนีสีขาว agar ใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง

22. Triple sugar iron test (TSI)

หลักการ

เพื่อดูความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาล Glucose, Lactose และ Sucroseร่วมกับการสร้าง Hydrogen sulfide มี phenol red เป็น pH Indicator ซึ่งพบปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ ต่างกันดังนี้

1. เชื้อหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว

พบ slant เป็นสีแดง และ bottom เป็นสีเหลือง เชื้อหมักย่อยกลูโคสให้กรดใน 4-5 ชั่วโมงแรกทำให้เกิดเป็นสีเหลืองของ phenol red เมื่อ glucose ถูกใช้หมดไป บริเวณ slant ที่มีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมากจะใช้ peptone เป็นอาหาร ทำให้ได้ผลผลิตเป็นด่าง จึงเปลี่ยนสีของ indicator กลับมาเป็นสีแดงภายในเวลา 18-24 ช.ม. ส่วนเชื้อที่เกิดขึ้นบนรอย stab บริเวณก้นหลอดจะมีจำนวนน้อยมาก ดังนั้นในเวลา 18-24 ช.ม. น้ำตาลจะยังถูกใช้ไม่หมดและด่างที่เกิดขึ้นจากการใช้ peptone ในภาวะ anaerobic เกิดขึ้นน้อยไม่เพียงพอต่อการเปลี่ยนสี indicator ได้ จึงเห็นเป็นสีเหลือง แต่ถ้าเพาะบ่มนานกว่า 24 ช.ม. glucose ย่อมถูกใช้หมดไป ทำให้เห็นสีแดงทั้งหมดหลอด ดังนั้นต้องอ่านผลใน 18-24 ช.ม.

2. <u>เชื้อหมักย่อย glucose, lactoseและ/หรือ sucose</u>

ทั้ง slant และ bottom เป็นสีเหลืองทั้งหมด ในช่วงแรกเชื้อจะใช้ glucose ก่อน เมื่อหมดแล้วจะใช้ lactoseและ/หรือ sucrose ต่อ ดังนั้นในเวลา 18-24 ช.ม. น้ำตาลในอาหารยังไม่หมดจึงได้กรดออกมาตลอดเวลา จึงเห็นเป็นสีเหลืองทั้งหมดหลอด แม้ว่าจะเพาะบ่มนาน 48 ช.ม.ก็ตาม

3. เชื้อไม่หมักเชื้อน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด

เชื้อจะใช้ peptone แทน ได้ผลผลิตเป็นด่าง ทำให้สี indicator เป็นสีแดงตลอดทั้งหมดหลอด

4. การเกิดก๊าซ

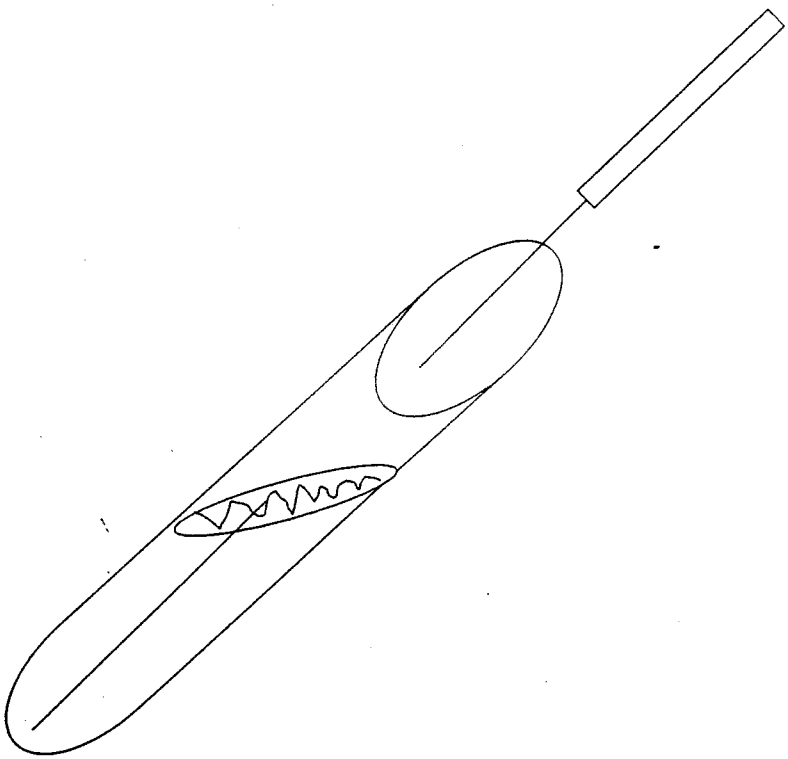
เชื้อบางชนิดสามารถหมักย่อยน้ำตาลแล้วให้กรดและก๊าซ ก๊าซที่เกิดขึ้นจะดันให้ agar แตก หรือเห็นเป็นฟองก๊าซในเนื้อ agar

5. <u>การสร้าง hydrogen sulfide</u>

เชื้อบางชนิดสามารถสร้าง hydrogen sulfide ได้จาก sodium thiosulfate H_2S ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ ferrous ammonium sulfate ได้ FeS เป็นตะกอนสีดำบริเวณก้นหลอด แต่การสร้าง H_2S เกิดขึ้นได้ดีในภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นที่ bottom จึงอยู่ในภาวะกรดและมีสีเหลือง

วิธีทดสอบ

ใช้ loop หรือ straight wire แตะเชื้อจาก โคโลนี streak เป็นเส้นตรงบน slant แล้ว stab ลงไปถึงก้นหลอด จากนั้น streak บน slant ให้เชื้อกระจายตัว ดังรูป



รูปที่ 9 แสดงวิธี streak และ stab เชื้อลงใน TSI

การแปลผล

อ่านจาก slant ไปยัง bottom โดยใช้สัญลักษณ์

A= Acid, สีเหลืองของ indicator

K= Alkaline, สีแดงของ indicator

N= Neutral, สีส้มเหมือนเดิม ไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ

g= gas

+= มีการสร้าง H_2S เกิดเป็นสีดำ

ผลที่เกิดขึ้นมี ดังนี้

K/A มีการหมักย่อย gulcose ไม่มีการหมักย่อย sucroseและ lactose

K/Ag มีการหมักย่อย gulcose และได้กาซไม่มีการหมักย่อย sucrose และ lactose

K/A+ มีการหมักย่อย glucoseและได้ H_2Sไม่มีการหมักย่อย sucrose และlactose

K/Ag+ มีการหมักย่อย glucose และได้กาซและ H_2S ไม่มีการหมักย่อย sucrose และlactose

A/A มีการหมักย่อย glucose, lactose และ /หรือ sucrose

A/Ag มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose และได้ก๊าซ

A/A+ มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือsucrose และได้ H_2S

A/Ag+ มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose ได้ก๊าซและ H_2S

K/K, K/N ไม่มีการหมักย่อย glucose, lactose และsucrose

23. Urease test

หลักการ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ urease สามารถย่อย urea ในอาหารได้เป็น amonium carbonate ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้สีของ indicator เป็นสีชมพูแดง

วิธีทดสอบ

แตะเชื้อจากโคโลนี แล้ว streak ขน slant เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง
ผลลบ	อาหารไม่เปลี่ยนแปลง

24. Voges Proskauer test

หลักการ

แบคทีเรียบางชนิดสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แล้วให้สาร acetyl methyl carbinol หรือ acetoin ที่เกิดขึ้นนั้น จะถูกออกซิไดซ์โดย potassium hydroxide ในภาวะที่มีออกซิเจนได้ diacetyl โดยมี d-napthol เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) diacetyl ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มี guanidine nucleus NH เช่น arginine, creatine ได้สารสีแดง

วิธีทดสออบ

แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บในตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ช.ม. หลังจากนั้น หยด VP-A(5%-napthol) และ VP-B (0.3% ceratine ใน 40% potassium hydroxide) ในอัตราส่วน 3:1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าหลอด 1 นาที ทิ้งไว้ 20 นาทีแล้วอ่านผล

การแปลผล

ผลบวก	มีสีแดงเกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ผลลบ	มีสีเหลืองซึ่งเป็นสีของน้ำยาที่ใช้ทดสอบ

25. XLD agar (Xylose-Lysine-Deoxycholate agar)

หลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำตาล lactose, sucrose , xylose และlysine นอกจากนี้มีสารช่วยสร้าง H_2S โดยมี phenol red เป็น pH indicator และ bile salt เป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาล lactose sucrose และ/หรือ xylose ได้ จะสร้างกรดและเปลี่ยนสีของโคโลนีและ agar ให้เป็นสีเหลือง ส่วนแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลไม่ได้เลยหรือเพียงบางชนิดจะใช้น้ำตาลก่อนแล้วใช้ lysine เป็นแหล่งอาหารต่อไปซึ่งจะได้ด่างเป็นผลผลิตสุดท้าย ทำให้สีของโคโลนีและ agar เป็นสีเหลือง ส่วนแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลได้ทุกชนิดรวมถึงใช้ lysine ได้ด้วย จะให้กรดมากกว่าด่างดังนั้น agar จึงเป็นสีเหลือง แบคทีเรียที่สร้าง H_2S ได้จะเกิดสีดำบนโคโลนี มักใช้ในการแยกเชื้อ *salmonella* app. ซึ่งจะให้โคโลนีสีดำบน agar สีแดง

26. ทดสอบเอนไซม์ β-galactosidase (ONPG) test

หลักการ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ β-galactodidase จะสามารถย่อย ONPG (c-nitrophenyl- β-D-galactopyranoside) ซึ่งไม่มีสี ได้ c-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง มีประโยชน์ในหารตรวจแบคทีเรียว่าเป็นพวกที่สามารถหมักย่อยแลคโตสได้หรือไม่ เพราะแบคทีเรียบางชนิดขาดเอนไซม์ permease ซึ่งจะพาแลคโตสเข้าสู่เซลล์และชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase สำหรับย่อยแลคโตส

วิธีทดสอบ

ใส่เชื้อลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 0.5 ml หยด toluene ลงไปในหลอด 1 หยด เขย่าแรง ๆ ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ONPG ลงไป0.5 ml เขย่าแล้วนำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส หรือทดสอบโดยใส่เชื้อลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 ml แล้วใส่เม็ด ONPG นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ช.ม.

การแปลผล

ผลบวก	สีเหลือง
ผลลบ	ไม่มีสี

บรรณานุกรม

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา และคณะ. ปฏิบัติการวิชา วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเชื้อรา.2541 หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Carter,G.R. and Cole,J.R> 1990 Diagnosis Procedure in Veterinary Bacteriology ans Mycology, 5th edition Academic Press Inc. California,USA.620 p.

Carter,G.R. and Chengappa,M.M. 1993 Microbial disease:A Veterinarians Giude to Laboratory Diagnosis Iowa State Universitu Press. Iowa, USA . 304 p.

Quinn,P.J., Catre,M.E., Markey,B.K.and Carter,G.R.1994. Clinical VeterimaryMicrogiology.1994 Mosby-Year book Europe Limited.Spain.688 p.

ผลปฏิบัติการที่ 4

จากปฏิกิริยาชีวเคมีที่แสดง จงอธิบายลักษณะผลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาชีวเคมีดังต่อไปนี้

1. Cataalase test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

2. Oxidase test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

3.OF-Glucose

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

4.Coagulase test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

5.Motility test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

6.Urease test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

7.TSI agar

A/A =----------

A/Ag =----------

A/Ag+ =----------

K/A+ =----------

K/Ag+ =----------

8.Lysine decarboxylase test

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

9. PR-manital

ผลบวก =----------

ผลลบ =----------

สรุป และวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 5
กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม
(Gram Positive Cocci Bacteria)

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

วัตถุประสงค์

1.เพื่อให้นักศึกษา ศึกษารูปร่างและลักษณะทั่วไปของโคโลนี

2.เพื่อให้นักศึกษา ศึกษารูปร่างเซลล์แบคทีเรีย จากการย้อมสีแกรม

3.เพื่อให้นักศึกษา ศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น

4.เพื่อให้นักศึกษา แยกชนิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นสกุลต่าง ๆ ได้

จุลชีพ

โคโลนีของแบคทีเรียดังต่อไปนี้ บน Blood Agar Plate

1. genus Staphylococcus

:*Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius* และ *S. epidermidis*

2.genus Streptococcus และ Enterococcus

:*Sterptococcus agalactiae, S. dysgalactiae S. uberis* และ *Enteroococcus faecalis*

3. unknown

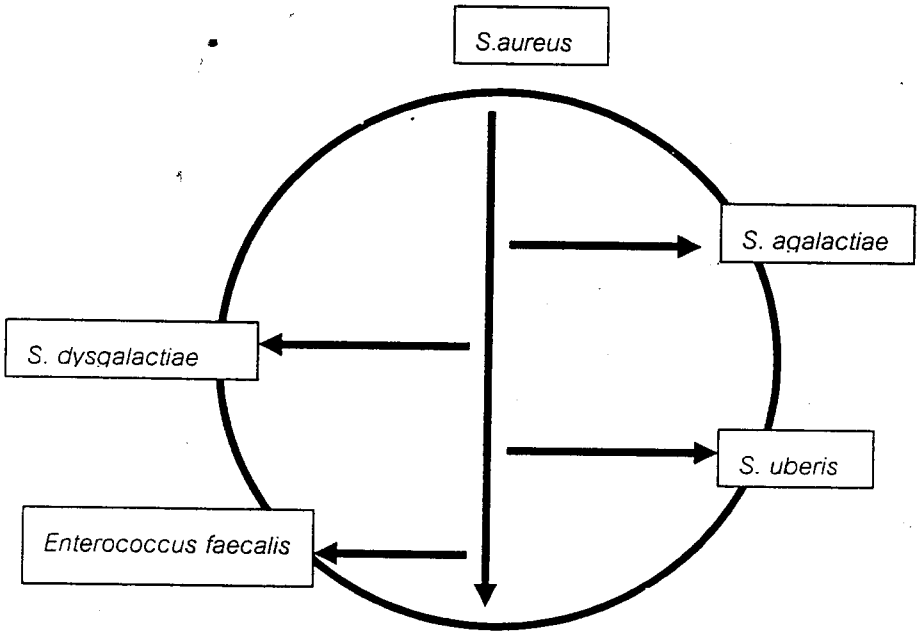
วัสดุและอุปกรณ์

1. loop และ straight wire
2. กระจก slide
3. ชุดย้อมสีแกรม
4. ชุดทดสอบ catalase test และ oxidase test
5. Rabbit plasma หรือ human plasma สำหรับทดสอบ coagulase test
6. PR-Mannitol, Sorbital , Raffiose และ Inositol
7. 10% Maltose ใน Purple Base
8. Blood agar plate สำหรับCAMPtest กับ *S. aureus*
9. 6.5% NaCl
10. Bile esculin
11. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

1. สังเกตรูปร่าง ขนาด ลักษณะ สี ความวาว ความใส ความขุ่น ขอบ ความโค้งนูน และการสลายเม็ดเลือดแดง(hemolysis) ของโคโลนี ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละชนิด
2. แตะเชื้อจาก โคโลนีบน Blood agar plate ลงบน slide แล้วนำไปย้อมสีแกรม
3. ทดสอบ Catalase test และ Oxidase test ของแบคทีเรียแต่ละชนิด
4. ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

- genus Staphylococcus (catalase +, oxidase -)
  - coagulase test
  - PR-Mannitol
  - ทดสอบการใช้น้ำตาล Maltose ใน 1% Maltose ใน Purple Agar base
- genus Streptococcus และ Enterococcus (catalase -, oxidase -)
  - PR-Mannitol – PR-Raffinose
  - PR-Sorbitol – PR-Inositol
  - 6.5%NaCl
  - Esculin hydrolysis
  - ทดสอบการสร้าง CAMP factor บนblood agar โดยใช้ loop แตะเชื้อจากโคโลนี ลากให้ตั้งฉาก แต่ไม่ชิดกับรอยที่เขี่ย *Staphylococcus aureus* ดังรูป



5. นำชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ลงเชื้อเรียบร้อยแล้ว ไปเพาะบ่มเชื้อในตู้ incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

6. อ่านและบันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับหนังสืออ้างอิง แล้ววิจารณ์ผลการทดลองที่เกิดขึ้น

7. เชื้อ unknown ที่ได้รับให้ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1 – 3 จากนั้นจึงไปเบิกชุดทดสอบทางชีวเคมีที่ตรงกับกลุ่มแบคทีเรียที่ได้ทำการทดสอบเบื้องต้น (colony, Gram, catalase และ oxidase) มาทำการทดสอบ unknown

บรรณานุกรม

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา และคณะ. ปฏิบัติการวิชา วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเชื้อรา 2541 หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Carter.G.R. and Cole,J.R. 1990. Diagnosis Procedure in Veterubary Bacteriology and Mycology, 5 th edition. Acadenuc Press Inc. California, USWA.620 p.

Carter.G.R. and Chengappa,M.M. 1993. Microbial diseade:A Veterinaruans Giude to Laboratory Diagnosis.Iowa State Universtiy Press. Iowa,USA.304p.

Quinn,P.J. Carter,M.E., Markey,B.K. and Carter,G.R.1994. Clinical Veterinary Microbiology.1994. Mosby-Year book Europe Limited. Spain.688 p.

ผลปฏิบัติการที่ 5

จุลชีพ	ลักษณะโคโลนีบน Blood agar	Catalase test	Oxidase test	Grams staining
Staphylococcus aureus				
S.intermedius				
S.epidermidis				
Sterptococcus agalactiae				
S.dysgalactiae				
S.uberis				
Enterococcus faecalis				

Genus Staphylococcus

จุลชีพ	PR-Mannitol	Coagulase test	1% maltose ในpurple agar base
S.aureus			
S.intermedius			
S.epidermidis			

Genus Streptococcus และ Enterococcus

จุลชีพ	PR-Mannitol	PR-Raffinose	PR-Inositol	PR-Sorbitol	Esculin hydrolysis	6.5% NaCl	CAMP test
S.agalactiae							
S.dysgalactiae							
S.ubetis							
E.faecalis							

unknow

Colony	Gram	catalase	oxidase	Biochemical test						

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 6
กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแรมบวก รูปร่างแท่ง
(Rod shape of Gram positive bacterias)

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา รูปร่างลักษณะโคโลนีของจุลชีพ
2. เพื่อศึกษา ลักษณะเซลล์และสปอร์ จากการย้อมสีแกรม
3. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมี
4. เพื่อให้นักศึกษา สามารถแยกเชื้อในกลุ่มนี้ตาม genus ที่กำหนดได้

จุลชีพ

โคโลนีของเชื้อ ดังต่อไปนี้ บน Blood agar

1. *Corynebacterium spp.*
2. *Bacillus cereus*
4. *unknown*

วัสดุและอุปกรณ์

1. loop และ straight wire
2. กระจก slide
3. ชุดย้อมสีแกรม และ สปอร์
4. ชุดทดสอบ Catalase test และ Oxidase test
5. อาหารทดสอบ OF-glucose
6. อาหารทดสอบ Motility และ Nitrate reduction
7. อาหารทดสอบ Urease
8. อาหารทดสอบ Esculin hydrolysis

วิธีการทดลอง

1. สังเกตรูปร่าง ขนาด ลักษณะ สี ความวาวความใส ความขุ่น ขอบ ความโค้งนูน และการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ของโคโลนี ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละชนิด รวมทั้ง unknown
2. แตะเชื้อจาก โคโลนีบน blood agar plate ลงบน slide แล้วนำไปย้อมสีแกรม และ สปอร์
3. ทดสอบ Catalase test และ Oxidase test ของแบคทีเรียแต่ละชนิด
4. ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี
5. นำชุดทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ลงเชื้อเรียบร้อยแล้ว ไปเพาะบ่มเชื้อตู้ incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง
6. อ่านและบันทึกผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่เกิดขึ้น

บรรณานุกรม

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา และคณะ. ปฏิบัติการวิชา วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเชื้อรา.2541 หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Carter, G.R.and Cole,J.R. 1990 Diagnosis Procedure in Veterimary Bacteriology and Mycology, 5 th edition. Academic Press Inc. Californoa, USA.620 p.

Carter,G.R. and Chengappa, M.M. 1993. Microbial disease:A Veterinarians Giude to Laboratory Diagnosis. Iowa State Universitu Press. Iowa,USA. 304 p.

Quinn, P.J. Carter, M.E. Markey, B.K. and Carter G.R..1994. Clinical Veterinary Microbiolgy.19943. Mosby-Year Book Europe Linited. Spain. 688p.

ผลปฏิบัติการ ที่ 6

	Corynebacterium spp.	*Bacillus cereus*	*unknown*
ลักษณะโคโลนีบน blood agar			
Grams staining			
Catalase test			
Oxidase test			
OF-Glucose			
Motility test			
Nitrate resuction test			
Urease test			
Esculin hydrolysis			

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 7
กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแรมลบ รูปร่างแท่ง ที่อาศัย ในทางเดินอาหาร
(Enteric gram negative - rod shaped bacteria)

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา รูปร่างลักษณะโคโลนีของจุลชีพ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษา ลักษณะเซลล์ จากการย้อยสีแกรม
3. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมีในแต่ละจุลชีพแต่ละชนิด
4. เพื่อให้นักศึกษา สามารถแยกเชื้อในกลุ่มนี้ตาม genus ที่กำหนด ได้

จุลชีพ

โคโลนีของเชื้อต่อไปนี้ บน Blood agar, MacConkey agar, XLD agar และ Brilliant green agar

1. *Escherichia coli*
2. *Klebseilla spp.*
3. *Proteus spp.*
4. *Salmonella spp*
5. unknown

วัสดุและอุปกรณ์

1. loop และ Straight wire
2. กระจก silde
3. ชุดย้อมสีแกรม
4. ชุดทดสอบ catalase test และ oxidase test
5. Lysine decarboxylase
6. TSI agar
7. Motility-Indole medium
8. Urease
9. Citrate
10. EMB agar

วิธีการทดลอง

1. สังเกตรูปร่าง ลักษณะ สี ความวาว ความใส ความขุ่น ขอบ ความโค้งนูน และการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ของโคโลนี ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละชนิด
2. แตะเชื้อจาก โคโลนี Agar Plate ลงบน slide แล้วนำไปย้อมสีแกรม

3. ทดสอบ Catalasr test และ Oxidasr test ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

4. ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

- TSI agar
- Motility- Indole test
-Urease test
- Citrat test
- EMB agar
- Lysine decarboxylase

5. นำชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีที่ลงเชื้อเรียบร้อยแล้วไปเพาะบ่มเชื้อที่ตู้ incubator ที่ 37 องศา เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโม ง

6. อ่านและบันทึกผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองที่เกิดขึ้น

บรรณานุกรม

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา และคณะ. ปฏิบัติการวิชา วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเชื้อรา. 2541. หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอรแก่น.

Carter, G.R> and Cole, J.R. 1990. Diagnisi Procedure in Veterinary Bacteriiology and Mycology, 5 th edition. Academic Press Inc. Californua, USA.620p.

Carter G.R. and Chengappa, M.M.1993 Microbial disease:A Vveterinarians Giude to Lavotatoru Diagnosis. lowa State Univertsitu press. lowa, USA. 304 p.

Quonn,P.J., Carter M.E. Markey B.K. and Carter G.R. 1994 Clinical Veterinary Mlcrobiology. 1994 Mosby-Year Book Europe limited.Spain 688 p.

ผลปฏิบัติการที่ 7

จุลชีพ	*Escherichia coli*	*Klebseilla spp*	*Proteus spp*	*Salmonella spp.*	unknown
ลักษณะโคโลนีบน Blood agar					
ลักษะโคโลนีบน MacConkey gar					
ลักษณะโคโลนีบน XLD agar					
ลักาณะโคโลนีบน Brillant green agar					
Grams staining					
Catalase test					
Oxidase test					
TSI agar					
Motility test					
Indole test					
Lysine Decarboxylase					
Urease test					
EMB agar					

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 8

กลุ่มเชื้อแบคทีเรียแรมลบ รูปร่างแท่ง ที่อาศัย นอกทางเดินอาหาร

(Non-enteric gram negative - rod shaped bacteria)

จารุวรรณ พัฒนาวงศ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา รูปร่างลักษณะโคโลนีของจุลชีพ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษา ลักษณะเซลล์ จากการย้อมสีแกรม
3. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมีในแต่จุลชีพแตะละชนิด
4. เพื่อให้นักศึกษา สามารถแยกเชื้อในกลุ่มนี้ตาม genus ที่กำหนด ได้

จุลชีพ

โคโลนีของเชื้อดังต่อไปนี้ บน Blood agar และ MacConkey agar

1. *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Aeromonas hydrophila*
3. *Pasteurella multocida*
4. *Pasteurella haemolytica* 5. *unknown*

วัสดุและอุปกรณ์

1. loop และ Straight wire
2. กระจกslide
3. ชุดย้อมสีแกรม
4. ชุดทดสอบ catalase test และ oxdase test
5. OF- glucose
6. OF-maltose
7. Motility และ Nitrate reducrion
8. Motility และ Indole
9. Urease
10. PR-mannitol
11. gelatin liquefaction
12. nutreint agar slant
13. 10 % lactose

วิธีทดลอง

1.สังเกตรูปร่าง ลักษณะ สี ความวาว ความใส ความขุ่น ขอบ ความโค้งนูน และการสลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) ของโคโลนีที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละชนิด

2. แตะเชื้อจากโคโลนี Blood agar plate ลงบน slide แล้วนำไปย้อยสีแกรม

3. ทดสอบ Catalase test และ Oxidase test

4. ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ดังนี้

Pseudomonas aeruginosa และ *Aeromonas hydrophila*

- TSI
- OF- Glucoese
- OF- Maltose
- Motitity - Nitrate และ Motility Indole test
- PR- Mannitol
- Gelatin liquefaction
- Nutreint agar slant
- Urease test - 10% lactose

Pasteurella mutocida และ *Pasteurella haemolytica*

- TSI
- OF-Glucose
- Motility - Indole test
- PR-mannitol
- Urease

5. นำชุดทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีที่ลงเชื้อเรียบร้อยแล้วไปเพาะบ่มเชื้อที่ตู้ incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่ว โม ง

6. อ่านและบันทึกผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

บรรณานุกรม

เรืองทอง กิจเจริญปัญญา และคณะ. ปฏิบัติการวิชา วิทยาแบคทีเรียและวิทยาเชื้อรา.2541. หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Carter, G.R. and Cole.J.R. 1990 Diagnosis Pricedure in Veterinary Bacteriology and Mucology,5 th edition Academic Press Inc. California, USA.620p.

Carter,G.R. and Chengappa M.M. 1993 Micribial disease:A Veterinarians Giude to Laboratrory Diagnosis Iowa Statre University Press. Iowa, USA.304p.

Quinn,P.J., Carter ,M.E., Markey, B.K. and Carter G.R., 1994 Clinical Veterimary Microbiology.1994 Mosby-Year Europe Limited. Spain 688 p.

ผลปฏิบัติการที่ 8

จุลชีพ	*Pseudomanas aeruginosa*	*Aeromonas hydrophila*	*Pasteurella multocida*	*Pasteurella haemolytica*	unknown
ลักษณะโคโลนีบน Blood agar					
ลักษณะโคโลนีบน MacConkey agar					
Grams staining					
Catalase test					
Oxidase test					
TSI					
OF- Glucose					
Motility test					
Urease					
Nitrate reduction test					
OF-Maltose					
Gelatin liquefaction					
Nutreint slant agar					
Indole test					
PR-Mannitol					
10 % lactose					

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 9

การวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Susceptibility Test)

ผศ. วราภรณ์ ศุกลพงศ์

การวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic) วัตถุประสงค์เพื่อดูความสามารถของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ในการยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางแก่สัตวแพทย์ในการเลือกใช้รักษาสัตว์ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพ อาจวัดแบบกึ่งปริมาณสังเคราะห์ (semi-quantitative) หรือแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative) ก็ได้

การวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแบบกึ่งปริมาณสังเคราะห์ เป็นวิธีการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะนั้นเป็นอย่างไร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียส่วนใหญ่ ซึ่งต้องการเพียงคุณภาพวิเคราะห์ เป็นวิธีที่ใช้กันมากเพราะสามารถทดสอบกับแบคทีเรียได้ครั้งละมาก ๆ วิธีที่ใช้คือ diffusion method

ส่วนการวัดความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแบบปริมาณวิเคราะห์ เป็นวิธีการทดสอบความไวยาที่ต้องการทราบว่า แบคทีเรียที่ทดสอบต้องใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนั้นปริมาณขั้นต่ำที่สุดเท่าใด จึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) และต้องใช้ปริมาณขั้นต่ำที่สุดเท่าใด จึงจะสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration : MBC)

ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะคุณภาพวิเคราะห์โดย diffusion method ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

Diffusion Method

ดัดแปลงจาก Kirby-Bauer Method

หลักการ

เป็นการทดสอบโดยใช้ยาปฏิชีวนะซึม (diffuse) เข้าเนื้อวุ้น (agar) แล้วดูการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอยู่บนผิววุ้น antibiotic ที่ใช้อาจอยู่ในรูปของ disc (กระดาษกรองรูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ชุบ antibiotic) หรืออยู่ในรูป tablet (ลักษณะเหมือนกับเม็ดยา) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของ antibiotic จะไม่สร้างโคโลนีเห็นเป็นบริเวณใส (clear zone) รอบแผ่นยา เรียกว่า zone of inhibition

วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียวแล้วดูขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้ พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้ถึงการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี diffusion method

อุปกรณ์

1. Mueller-Hinton agar plate
2. Bovine blood –Mueller-Hinton agar plate สำหรับ *Streptococcus* spp.
3. เชื้อแบคทีเรีย: *Staphylococcus aureus* *Streptococcus agalacteriae*
   Escherichia coli

4. Sterile brain-heart infusion broth 5 มิลลิลิตร/หลอด
5. McFarland No. 0.5 turbidity standard
6. แผ่นยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ
7. Sterile swab
8. Forceps

วิธีทดสอบ

1. เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งเจริญบน blood agar น้อยกว่า 24 ชั่วโมง จำนวน 3-5 โคโลนี
2. ใช้ loop แตะเฉพาะส่วนบนของโคโลนี นำมาใส่ในหลอดแก้วที่มีอาหารเหลว ปริมาณ 4-5 มิลลิลิตร
3. บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-8 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนได้มากเพียงพอต่อการทดสอบ ซึ่งปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นนี้จะทำให้อาหารเหลวมีความขุ่นมากขึ้นด้วย
4. ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland Standard (วิธีการเตรียมดูตารางที่ 1)
   - ถ้าความขุ่นน้อยกว่าความขุ่นมาตรฐาน ให้แตะเชื้อใส่ลงในหลอดเพิ่ม หรือเพิ่มเวลาในการเพาะบ่มนานขึ้น ให้ได้ความขุ่นเท่ากับความขุ่นมาตรฐาน
   - ถ้าความขุ่นมากกว่ามาตรฐาน ให้เจือจางด้วยอาหารเหลวที่ใช้ในข้อ 2
   - ความขุ่นเชื้อน้อยกว่าความขุ่นมาตรฐาน จะทำให้เกิด zone of inhibition กว้างกว่าความเป็นจริง
   - ความขุ่นเชื้อมากกว่าความขุ่นมาตรฐาน จะทำให้เกิด zone of inhibition แคบกว่าความเป็นจริง
5. ใช้สำลีพันปลายไม้ (swab) ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อผ่านการเทียบความขุ่นแล้ว กดปลายสำลีกับด้านในหลอดให้พอหมาด ๆ
6. ป้ายเชื้อบน Muller Hinton Agar (MHA) ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร (เท agar 25 มิลลิลิตร) และผ่านการผึ่งผิวหน้าไม่ให้หยดน้ำเกาะ ลากผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายตั้งฉากถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าหมุนจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นเดียวกัน ทำอย่างนี้ 3 ครั้งเพื่อให้แบคทีเรียกระจายทั่วผิวหน้า agar
   - **สำหรับเชื้อ streptococci ใช้ MHA + 5-10 % bovine blood**
7. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ให้ผิวหน้าแห้ง
8. วางแผ่นยาโดยใช้ปากคีบ (forceps) ที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นยา วางบนผิวหน้า agar แล้วกดเบา ๆ เพื่อให้แนบสนิทกับผิว agar

   การวางแผ่นยา – แต่ละแผ่นวางห่างจากขอบ petri dish 15 มิลลิเมตร และแต่ละแผ่นวางให้ห่างกัน 15-20 มิลลิเมตร
9. คว่ำ petri dish และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส
10. อ่านผลหลังจากบ่มไว้ 18-24 ชั่วโมง โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone of inhibition เป็นมิลลิเมตร

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของ 0.048 M $BaCl_2$ (1.175% w/v $BaCl_2 . 2H_2O$) และ 0.36 N H_2SO_4 (1% v/v) เพื่อเตรียม $BaSO_4$ standard หรือ McFarland เบอร์ต่าง ๆ

Tube No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Approx. Cell density ($X 10^8$/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ที่มา : มาลิน จุลศิริ (2532)

การแปรผล

นำขนาดของ zone of inhibition ที่วัดได้ เทียบกับตารางมาตรฐาน ดังตารางที่ 2 ซึ่งการแปลผลจะมี 3 ลักษณะ ดังนี้

ไว (susceptible) ซึ่งหมายถึงว่าในการติดเชื้อที่ทดสอบสามรถรักษาได้ด้วยยาที่ให้ผล

กึ่งกลางหรืออาจจะไว (intermediate) ถือเป็น buffer zone ซึ่งเป็นช่วงที่ถือว่าให้ระวังปัจจัยในการทำที่จะกระทบต่อการแปลผล ถ้าขนาดบริเวณใสอยู่ในช่วงนี้แสดงว่าได้ผลกำกึ่งระหว่างไวและดื้อ

ดื้อ (resistant) ซึ่งหมายถึงว่า เชื้อจะไม่ยับยั้งด้วยความเข้มข้นของยาได้ในเลือดหรือเนื้อเยื่อ (เมื่อใช้ขนาดปกติ)

ผลการทดลอง

Antimicrobial Agent	Concentration	*Staphylococcus aureus*		*E.coli*		*Streptococcus agalactiae*	
		Zone (mm)	S, I, or R	Zone (mm)	S, I, or R	Zone (mm)	S, I, or R

สรุปและวิจารณ์

ตารางที่ 2. ตารางมาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อต่อ antibiotic ชนิดต่าง ๆ

Antimicrobial Agent	Disk Code	INTERPRETIVES STANDARDS			
		Resistant (mm or less)	Intermediate	Moderately Susceptible(mm range)	Susceptible (mm or more)
Amikacin 30 mcg	AN 30	14	15-16		17
Amoxicillin 20 mcg/Clavulanic Acid 10 mcg	AMC 30				
When testing *Haemophilus* and staphylococci		19			20
When testing other organisms		13		14-17	18
Ampicillin 10 mcg	AM 10				
When testing gram-negative enteric organisms		13		14-16	17
When testing staphylococci		28			29
When testing *Haemophilus*		21	22-24		25
When testing enterococci		16		17	
When testing non-enterococcal streptococci		21		22-29	30
When testing *L. monocytogenes*		19			20
Ampicillin 10 mcg/Sulbactam 10 mcg	SAM 20				
When testing gram-negative enterics and Staphylococci		11		12-14	15
When testing *Haemophilus*		19			20
Apramycin 15 mcg (veterinary)	AP 15	11	12-14		15
Azlocillin 75 mcg when testing *Pseudomonas*	AZ 75	17			18
Aztreonam 30 mcg	ATM 30	15		16-21	22
When testing *Haemophilus*					26
Bacitracin 10 units	B 10	8	9-12		13
Carbenicillin 100 mcg	CB 100				
When testing other gram-negative organisms		19		20-22	23
When testing *Pseudomonas*		13		14-16	17
Cefaclor 30 mcg	CEC30	14		15-17	18
When testing *Haemophilus*		18	19-23		24
Cefamandole 30 mcg	MA 30	14		15-17	18
When testing *Haemophilus*		20	21-23		24

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Antimicrobial Agent	Disk Code	INTERPRETIVES STANDARDS			
		Resistant (mm or less)	intermediate	Moderately Susceptible(mm range)	Susceptible (mm or more)
Cefazolin 30 mcg	CZ 30	14		15-17	18
Cefixime 5 mcg	CFM 5	15		16-18	19
When testing *Haemophilus*					21
When testing *N. gonorrhoeae*					31
Cefmetazole 30 mcg	CMZ 30	12		13-15	16
Cefonicid 30 mcg	CID 30	14		15-17	18
When testing *Haemophilus*		20	21-23		24
Cefoperazone 75 mcg	CFP 75	15		16-20	21
Cefotaxime 30 mcg	CTX 30	14		15-22	23
When testing *Haemophilus*					26
When testing *N. gonorrhoeae*					31
Cefotetan 30 mcg	CTT 30	12		13-15	16
When testing *N. gonorrhoeae*		19	20-25		26
Cefoxitin 30 mcg	FOX 30	14		15-17	18
When testing *N. gonorrhoeae*		23	24-27		28
Ceftazidime 30 mcg	CAZ 30	14		15-17	18
When testing *Haemophilus*					26
When testing *N. gonorrhoeae*					31
Ceftiofur 30 mcg (veterinary)	XNL 30	19	20-23		24
Ceftizoxime 30 mcg	ZOX 30	14		15-19	20
When testing *Haemophilus*					26
Ceftriaxone 30 mcg	CRO 30	13		14-20	21
When testing *Haemophilus*					26
When testing *N. gonorrhoeae*					35
Cefuroxime 30 mcg (Sodium)	CXM 30	14		15-17	18
When testing *Haemophilus*		20	21-23		24
When testing *N. gonorrhoeae*		25		26-30	31

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Antimicrobial Agent	Disk Code	INTERPRETIVES STANDARDS			
		Resistant (mm or less)	intermediate	Moderately Susceptible(mm range)	Susceptible (mm or more)
Cephalothin 30 mcg	CR 30	14		15-17	18
Chloramphenicol 30 mcg	C 30	12	13-17		18
When testing *Haemophilus*		25	26-28		29
Chlortetracycline 30 mcg	A 30	14	15-18		19
Cinoxacin 100 mcg urinary tract specific	CIN 100	14	15-18		19
Ciprofloxacin 5 mcg	CIP 5	15		16-20	21
When testing *Haemophilus*					21
Clindamycin 2 mcg	CC2	14	15-20		21
Cloxacillin 1 mcg	CX 1	19			20
Colistin 10 mcg	CL 10	8	9-10		11
Dicloxacillin 1 mcg	DX 1	10	11-12		13
Doxycycline 30 mcg	DO 30	12	13-15		16
Enrofloxacin 5 mcg (veterinary)	ENO 5	15	16-20		21
Erythromycin 15 mcg	E 15	13	14-22		23
Gentamicin 10 mcg	GM 10	12	13-14		15
Imipenem 10 mcg	IPM 10	13		14-15	16
When testing *Haemophilus*					16
Kanamycin 30 mcg	K 30	13	14-17		18
Methicillin 5 mcg when testing staphylococci	ME 5	9	10-13		14
Meziocillin 75 mcg	MZ 75				
When testing *Pseudomonas*		15			16
When testing other gram-negative organisms		17		18-20	21
Minocycline 30 mcg	MIN 30	14	15-18		19
Moxalactam 30 mcg	MOX 30	14		15-22	23
Nafcillin 1 mcg when testing staphylococci	NF 1	10	11-12		13
Nalidixic Acid 30 mcg urinary tract specific	NA 30	13	14-18		19
Neomycin 30 mcg	N 30	12	13-16		17

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Antimicrobial Agent	Disk Code	INTERPRETIVES STANDARDS			
		Resistant (mm or less)	intermediate	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
Netilmicin 30 mcg	NET 30	12	13-14		15
Nitrofurantoin 300 mcg urinary tract specific	FD 300	14	15-16		17
Norfloxacin 10 mcg urinary tract specific	NOR 10	12	13-16		17
Novobiocin 30 mcg	NB 30	17	18-21		22
Ofloxacin 5 mcg	OFX 5	12		13-15	16
When testing *Haemophilus*					16
When testing *N. gonorrhoeae*					31
Oxacillin 1 mcg	OX 1				
When testing staphylococci		10	11-12		13
When testing pneumococci for penicillin G Susceptibility		19			20
Oxytetracycline 30 mcg	T 30	14	15-18		19
Penicillin G 10 units	P 10				
When testing staphylococci		28			29
When testing enterococci		14		15	
When testing *L. monocytogenes*		19			20
When testing non-enterococcal streptococci		19		20-27	28
When testing *N. gonorrhoeae*		26		27-46	47
Piperacillin 100 mcg	PIP 100				
When testing *Pseudomonas*		17			18
When testing orther gram-negative organisms		17		18-20	21
Polymyxin B 300 units	PB 300	8	9-11		12
Rifampin 5 mcg	RA 5	16	17-19		20
SxT 25 mcg	SxT 25	10		11-15	16
When testing *Haemophilus*		10	11-15		16
Streptomycin 10 mcg	S 10	11	12-14		15
Sulfadiazine 300 mcg urinary tract specific	SD 300	12		13-16	17
Sulfisoxazole 300 mcg urinary tract specific	G 300	12		13-16	17

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Antimicrobial Agent	Disk Code	INTERPRETIVES STANDARDS			
		Resistant (mm or less)	intermediate	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
Tetracycline 30 mcg	TE 300	14	15-18		19
When testing *Haemophilus*		25	26-28		29
When testing *N. gonorrhoeae*		30		31-37	38
Ticarcillin 75 mcg	TIC 75				
When testing *Pseudomonas*		14			15
When testing qther gram-negative organisms		14		15-19	20
Ticarcillin 75 mcg/Clavulanic Acid 10 mcg	TIM 85				
When testing *Pseudomonas*		14			15
When testing qther gram-negative organisms		14		15-19	20
Tobramycin 10 mcg	TM 10	12	13-14		15
Trimetroprim 5 mcg urinary tract specific	TMP5	10		11-15	16
Triple Sulfa 300 mcg urinary tract specific	SSS 300	12		13-16	17
Vancomycin 30 mcg	VA 30				
When testing enterococci		14	15-16	17	
When testing other gram-negative organism		9	10-11		12

ปัจจัยที่ทำให้ผลการรักษา ไม่สัมพันธ์กับผลการวัดความไวต่อ antibiotic ของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

ปัจจัยดังกล่าว มีดังต่อไปนี้

1. กระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายสัตว์ มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ antibiotic บางชนิด
2. ความเข้มข้น หรือระยะคงตัวของ antibiotic ตรงตำแหน่งที่เชื้ออยู่ในตัวสัตว์นั้นน้อยเกินไป
3. ภาวะกรด-ด่างของต่อมน้ำนม ทำให้ antibiotic ทำงานได้ไม่เต็มที่
4. antibiotic จับกับโปรตีนในเต้านม
5. antibiotic ถูกย่อยสลายเร็ว
6. antibiotic ชนิดนั้น ถูกรบกวนด้วย antibiotic อื่น ทำให้การรักษาไม่ได้ผล

7. antibiotic ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียที่เจริญเร็ว ทำงานได้ไม่เต็มที่เนื่องจากหนอง (pus) ทำให้แบคทีเรียเจริญช้าลง

8. แร่ธาตุบางอย่าง เช่น แคลเซียม (จากขบวนการทางสรีรวิทยา) ต่อต้านการออกฤทธิ์ของ antibiotic บางชนิดได้

บรรณานุกรม

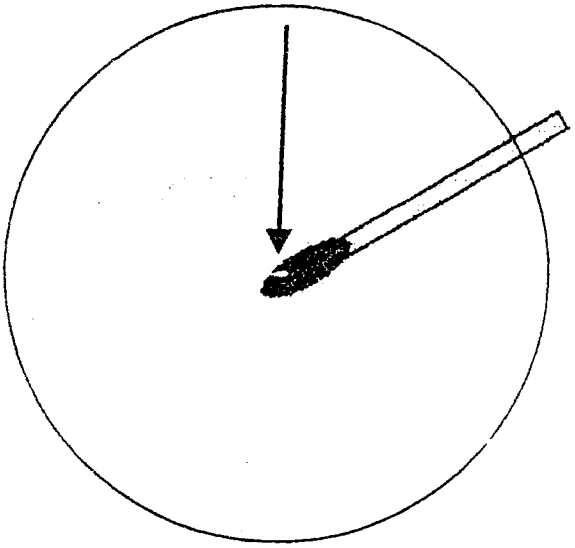
อรษา สุตเธียรกุล และพิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ 2536 การเจริญพันธุ์และการเจริญเติบโต สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร (บรรณาธิการ) **แบคทีเรียพื้นฐาน** พิมพ์ครั้งที่ 1 ตำราของคณะกรรมการข่ายงานเพื่อพัฒนาและประสานงานในด้านการสอน และการวิจัยในสาขาจุลชีววิทยา ปรสิตวิทยาและอิมมิวโนวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล โรงพิมพ์ศิริยอด จำกัด ประเทศไทย หน้า 62-64

มาลัย วรจิตร และมาลิน จุลศิริ 2536 สารต้านแบคทีเรียและการดื้อยา สุวณี สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร (บรรณาธิการ) **แบคทีเรียพื้นฐาน** พิมพ์ครั้งที่ 1 ตำราของคณะกรรมการข่ายงานเพื่อพัฒนาและประสานงานในด้านการสอนและการวิจัยในสาขาจุลชีววิทยา ปรสิตวิทยาและอิมมิวโนวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล โรงพิมพ์ศิริยอด จำกัด ประเทศไทย หน้า 203-205

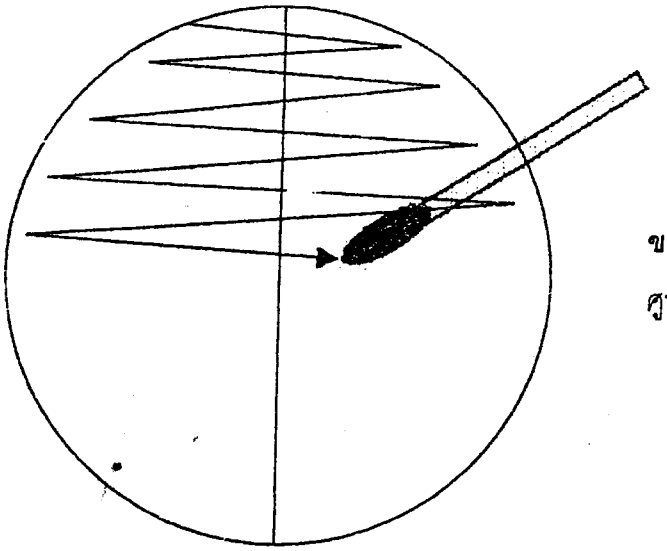
มาลิน จุลศิริ 2532 **ยาต้านจุลชีพ : ความรู้มาตรฐานและประยุกต์** โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต ประเทศไทย

National Mastitis Council. 1987. **Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis.** W.D. Hoard & Sons Co., WI, USA. pp 43-172.

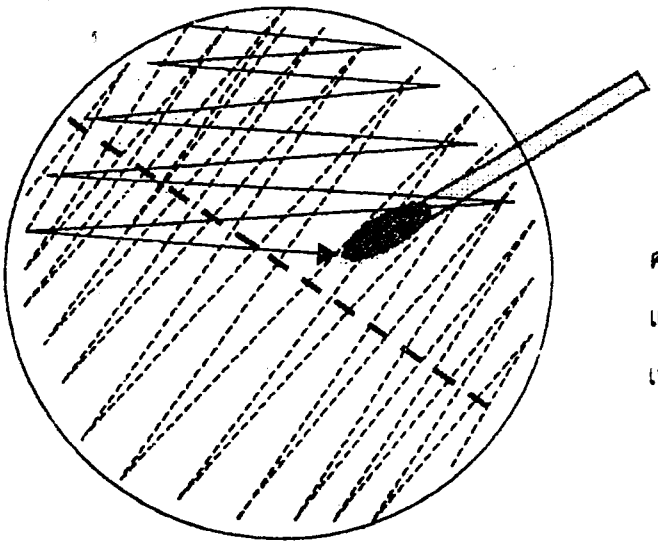
Norrel ,S.A. and Messley , K.E. 1997. **Microbiology Laboratory Manual : Principles and Applications .** Prentice-Hall , Inc.



ก. swab จุ่มเชื้อหมาดๆ ลากผ่านเส้นผ่า-ศูนย์กลางของ petri dish

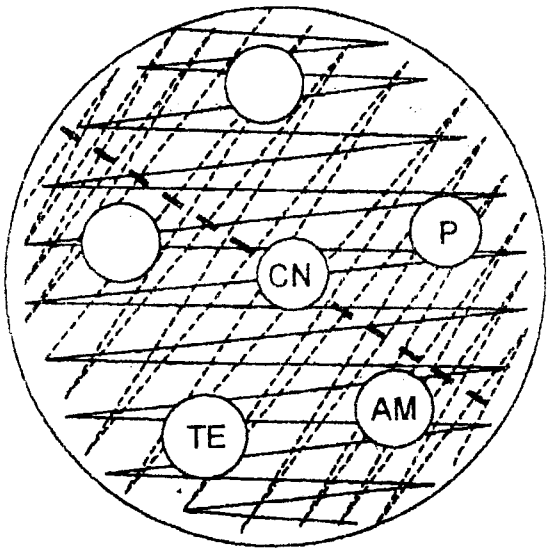


ข. streak ถี่ๆ ผ่านและตั้งฉากกับเส้นผ่า-ศูนย์กลาง ที่ลากจาก ก. โดยใช้ swab อันเดิม

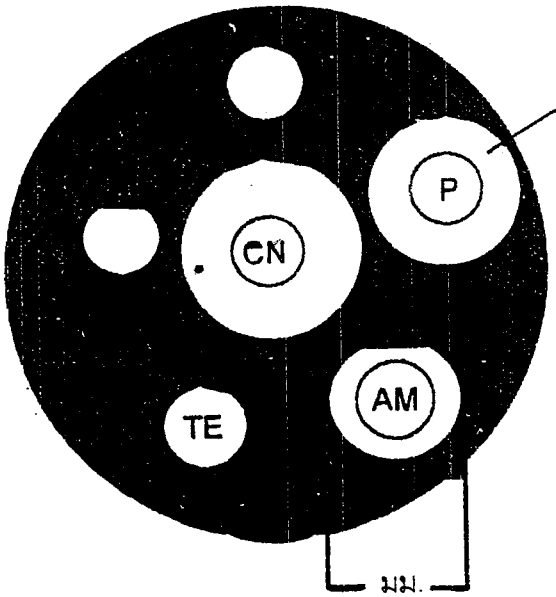


ค. หมุน petri dish ไปจากแนวเดิม 60 องศา แล้ว streak เช่นเดียวกับ ข. จากนั้นทำซ้ำเช่นเดียวกับ ค. อีก 1 ครั้ง

รูปที่ 10 แสดงการทดสอบความไวต่อยา



ง. วางแผ่นยาลงบนผิวหน้าของอาหารวุ้น MHA



จ. วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone of inhibition โดยผ่านแผ่นยา = ... มม. นำไปเทียบกับค่ามาตรฐาน แล้วแปลผลเป็น S ,I หรือ R

ตัวอย่างเช่น **CN, P = S**

AM = I

K, C, TE = R

ผลปฏิบัติการที่ 9

Antimicrobial agent	Concentration	*Staphylococcus aureus*		*Escherichai coli*		*Streptococcus agalactiae*	
		Zone(mm)	S, I, R	Zone(mm)	S, I, R	Zone(mm)	S, I, R

สรุปและวิจารณ์

ปฏิบัติการที่ 10

การนับเซลล์ที่มีชีวิต (Viable Count หรือ Colony Count)

ผศ. วราภรณ์ ศุกลพงศ์

หลักการ

วิธีการนี้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น นำตัวอย่างที่ต้องการตรวจนับเชื้อแบคทีเรีย มาทำให้เจือจางเป็นลำดับ (1 : 10)ในอาหารเหลวเสียก่อน แล้วนำตัวอย่างในแต่ละหลอด ที่มีความเจือจางต่าง ๆมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หนึ่งโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อถือว่า มาจากแบคทีเรีย 1 ตัว หรือ 1กลุ่ม

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตนั้น มีหลายวิธีด้วยกัน คือ plate count (ซึ่งแบ่งเป็น pour plate และ spread plate), roll tube count, drop count method, membrane filter count, most probable numbers (MPN) และ automated method ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ plate count แบบ pour plate เท่านั้น

Pour Plate

วิธีทำ

1. แช่ อาหารเลี้ยงเชื้อ standard plate count agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใน water bath
2. การเจือจางตัวอย่างน้ำนมแบบ ten fold dilution (รูปที่)

2.1 ปิเปตต์ 0.1%peptone water ที่ปราศจากเชื้อจำนวน 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 หลอด (แต่ละหลอดเรียกว่า dilution blank)

2.2 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำนมซึ่งผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด dilution blank ที่ 1 ผสมให้เข้ากัน

2.3 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำนมเจือจางหลอดที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอด dilution blank ที่ 2 ผสมให้เข้ากัน

2.4 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำนมเจือจางหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอด dilution blank ที่ 3 ผสมให้เข้ากัน

2.5 เจือจางตัวอย่างน้ำนมเหมือนข้อ 2.4 ลงในหลอดที่ 4 ถึง หลอดที่ 10 โดยหลอดที่ 10 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำนม เจือจาง 1 มิลลิลิตรทิ้งไป ดังนั้นทุกหลอดจะมีน้ำนมเจือจาง 9 มิลลิลิตร

3. ปิเปตต์น้ำนมเจือจางจากหลอดที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน petri dish ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แต่ละ dilution ควรทำ 2-4 plate
4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Plate Count Agar จากข้อ1 ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร (ความหนาประมาณ 4 มม.) ลงใน petri dish ในข้อ 3 จากนั้นหมุน petri dish ให้หมุนวนไปรอบ ๆหลายครั้งอย่างรวดเร็ว ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มแข็ง
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้อาหารวุ้นแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ช.ม.
6. ตัวอย่างน้ำนมเจือจางหลอดที่ 2-5 ทำเช่นเดียวกับข้อ 3-5

การนับโคโลนี

นับจำนวนโคโลนีในแต่ละ petri dish และเลือกเอา petri dish ที่มีจำนวนโคโลนี อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี มาคำนวณ

การคำนวณนั้นมีหน่วยเป็น colony forming unit (cfu)/มิลลิลิตร หรือ viable count/มิลลิลิตร

สูตรการคำนวณ

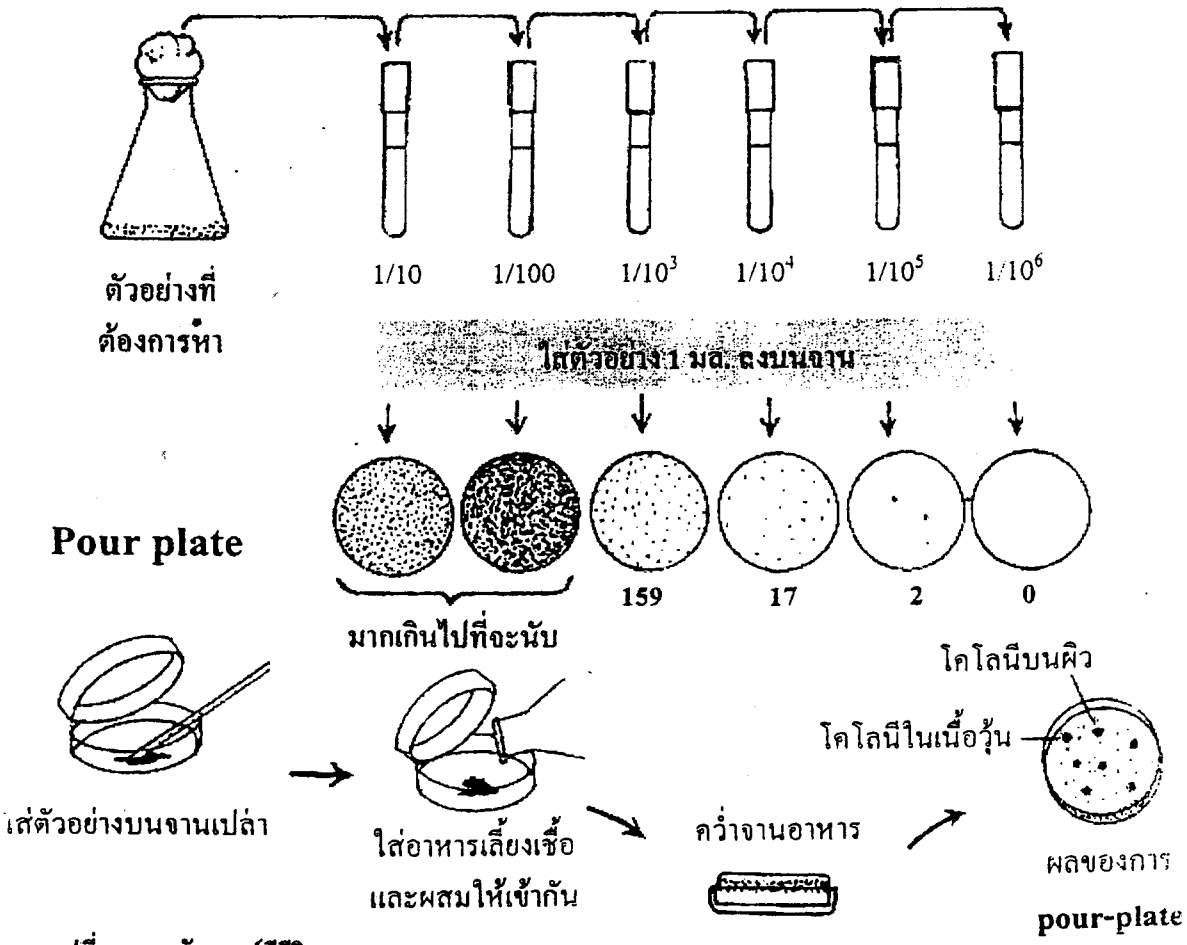
$$X = N \times 10^{n} \text{ cfu/มิลลิลิตร}$$

โดย X = จำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร

N= ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่ได้จากตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

n = dilution factor ของหลอดที่นับจำนวนแบคทีเรีย

การนับอาจใช้อาจใช้ดินสอเขียนแก้วนับโคโลนี หรือใช้เครื่องนับ (colony counter) ซึ่งอาจมีเข็มหรือปากกาจิ้มโคโลนี ตัวเลขจะปรากฏขึ้น ซึ่งทั้ง 2 วิธีนำมาคำนวณหาจำนวนโคโลนีทั้งหมด / มิลลิลิตรโดยใช้สูตรดังกล่าว



รูปที่ 11 การนับเซลล์มีชีวิต

บรรณานุกรม

Collins,C.H., Lyne,P.M. and Grange,J.M.1989. **Collins and Lyne's Microbiological Method**.6th Ed.Butterworths .

Morello , J.A., Mizer , H.E. and Wilson , M.E. 1998. **Laboratory Manual and Workbook in Microbiology : Applications to Patient Care.** 6th Ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Quinn,P.J.,Carter,M.E.,Markey,B.K.and Carter,G.R.1994.**Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe

ผลปฏิบัติการที่ 10

1:10 Plate : viable count =.....CFU/ml

1: 100 Plate : viable count =.....CFU/ml

1: 1000 Plate : viable count =.....CFU/ml

1: 100000 Plate : viable count =.....CFU/ml

1: 100000 Plate : viable count =.....CFU/ml

ดังนั้น viable count **ของน้ำนมดิบ** =.....CFU/ml

สรุปและวิจารณ์

การเพาะเลี้ยงและแยกพิสูจน์เชื้อรา

Cultivation and Identification of Fungi

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

บทนำ

เชื้อราก่อโรคที่สำคัญที่นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการมีทั้งเชื้อราที่เป็น yeast และ mold ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคได้ถ้าขาดความระมัดระวังในการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสปอร์ของเชื้อราค่อนข้างเบาและสามารถแพร่กระจายไปในบรรยากาศได้ง่าย ดังนั้น จึงควรเพิ่มความระมัดระวังในระหว่างการศึกษา

การป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อราขณะทำการทดลอง สามารถทำได้ดังนี้

1. ก่อนการปฏิบัติการทดลอง ใช้ผ้าชุบน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น 2% savlon บิดหมาด ๆ ปูบนพื้นโต๊ะในบริเวณที่ต้องการใช้ในการถ่ายเชื้อ หรือเขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันสปอร์แพร่ไปยังบริเวณอื่น ๆ
2. ไม่ควรเปิดพัดลมขณะทำการเขี่ยเชื้อ
3. ระหว่างการเขี่ยเชื้อ พยายามอย่าให้มือไปสัมผัสเชื้อราโดยตรง
4. การ sterile เข็มที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ ไม่ควรเผาตรงกลางเปลวไฟ เพราะจะทำให้เชื้อราเกิดการเผาไหม้รุนแรงและกระเด็นกลายเป็นละอองเล็ก ๆ ควรเผาบริเวณรอบ ๆ ของเปลวไฟจนร้อนแดง
5. สไลด์หรืออุปกรณ์ที่ใช้แล้วให้ทิ้งลงใน 5% phenol หรือ lysol แล้วนำไปอบใน autoclave ต่อไป
6. หลังจากเสร็จสิ้นการทดลอง เช็ดบริเวณพื้นโต๊ะที่ทำการทดลองอีกครั้งด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
7. ล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่ เมื่อเสร็จการทดลองหรือเมื่อสัมผัสกับเชื้อราโดยบังเอิญ

เชื้อราก่อโรคที่สำคัญ แบ่งออกเป็น 5 พวกคือ

1. Superficial mycoses หรือ subcutaneous mycoses เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง โดยเชื้อราจะทำลายส่วนของ superficial keratinized tissue ได้แก่ เล็บ ผิวหนัง ขน หรือผม เชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่ม Dermatophyte ซึ่งแบ่งเป็น genus *Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton*
2. Subcutaneous mycoses ได้แก่ เชื้อราที่ก่อโรคบริเวณ subcutaneous tissue เช่น *Sporothrix schenckii, Rhinosporidium seeberi*
3. Systemic mycoses หรือ Deep mycoses ได้แก่ เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น กระดูก ปอด ฯลฯ เชื้อราเหล่านี้ ได้แก่ *Histoplasma capsulatum*
4. Opportunistic systemic mycoses ได้แก่ เชื้อราที่อาจพบได้ทั่วไปในบรรยากาศและสามารถก่อให้เกิดโรคได้เมื่อร่างกายเกิดผิดปกติทางสรีรวิทยาหรือบกพร่องทางระบบภูมิคุ้มกัน เชื้อราเหล่านี้ ได้แก่ *Penicillium*, spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Candida albicans, Cryptococcus neoformans*
5. Bacterial infection similar to systemic mycoses ได้แก่ เชื้อราที่มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายแบคทีเรีย เช่น *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp. เป็นต้น

วิธีการแยกเชื้อรา

ในกรณีที่สงสัยโรคติดเชื้อรา การแยกเชื้อราอาจทำได้ดังนี้

1. แยกเชื้อราโดยเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม โดยทั่วไปนิยมใช้ Sabouraud dextrose agar (SDA) หรืออาจเลือกใช้ Special media หรือ enrichment media อื่น ๆ เช่น Potato dextrose agar, cornmeal agar, rice grain agar dermatophyte medium เป็นต้น

2. แยกเชื้อราโดยฉีดเข้าสัตว์ทดลอง โดยการนำชิ้นส่วนของเชื้อรา เช่น เส้นใยหรือสปอร์ฉีดเข้าในสัตว์ทดลองชนิดต่าง ๆ เช่น หนูถีบจักร หนูตะเภา กระต่าย เป็นต้น

วิธีการพิสูจน์วินิจฉัยเชื้อรา

1. ตรวจดูลักษณะโคโลนีของเชื้อราด้วยตาเปล่า (Macroscopic examination) เป็นการศึกษาลักษณะทางกายภาพต่าง ๆ ของเชื้อรา ได้แก่

   1.1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ

   1.2 ลักษณะของโคโลนี เช่น ขอบเขตโคโลนี ลักษณะโคโลนีเรียบหรือนูน เป็นต้น

   1.3 ขนาดของโคโลนี

   1.4 ลักษณะเนื้อของโคโลนี เช่น โคโลนีเป็นผง หรือ โคโลนีคล้ายขนสัตว์ เป็นต้น

   1.5 ดูการสร้างสีของเชื้อราที่ขึ้นบนผิวโคโลนี

   1.6 ดูการสร้างสีที่ด้านล่างของโคโลนี

2. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำได้ 3 วิธี คือ

   2.1 Direct mounting technique

   2.2 Cellophane-tape coverslip mount technique

   2.3 Slide culture technique

3. การตรวจโดยอาศัยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา เช่น carbohydrate fermentation test, carbohydrate assimilation test เป็นต้น

ปฏิบัติการที่ 11
การเพาะเลี้ยงเชื้อรา
Cultivation of Fungi

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

ปฏิบัติการที่ 11.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษามีทักษะเกี่ยวกับวิธีการเพาะเชื้อรา

อุปกรณ์

1. Sabouraud dextrose agar tube (SDA)
2. เข็มเขี่ยเชื้อรา
3. ตะเกียงบุนเสน
4. ผ้าชุบน้ำยาฆ่าเชื้อบิดหมาด ๆ

วิธีทำ

1. ปูผ้าชุบน้ำยาฆ่าเชื้อบนโต๊ะบริเวณที่จะใช้ในการปฏิบัติงาน
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเผาไฟจนแดงแล้วรอให้เย็นลงเล็กน้อย
3. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราแตะกรีดบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ดดย Sterile technique
4. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราเขี่ยเชื้อที่เตรียมไว้แล้วแตะลงบนพื้นผิว agar ที่กรีดไว้
5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 สัปดาห์
6. คอยสังเกตการเจริญของเชื้อราแล้วบันทึกผล

บทปฏิบัติการที่ 11.2 เทคนิคการเพาะเชื้อราโดยวิธี slide culture

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกทักษะในการทำ slide culture และศึกษาลักษณะของเชื้อราจากการเตรียมสไลด์ด้วยวิธี slide culture

อุปกรณ์

1. เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. sterile petridish ซึ่งภายใน petridish มี glass slide, cover glass และแท่งแก้วรูปตัววี
3. sterile distilled water
4. Sabouraud dextrose agar ซึ่งเตรียมใน petridish
5. Forceps
6. ใบมีด
7. เข็มเขี่ยเชื้อรา
8. ตารางสำหรับตัด agar block
9. ตะเกียงบุนเสน

วิธีทำ

1. ตัด agar block เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ยาวด้านละ 1 เซนติเมตร โดยใช้ตารางแบ่งวางไว้ petridish แล้วใช้ใบมีดตัด โดย sterile technique
2. ใช้ forceps จัด glass slide วางบนแท่งแก้วรูปตัววี โดย sterile technique
3. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา หยิบชิ้น agar block มาวางบน glass slide ที่เตรียมไว้ใน petridish
4. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา เขี่ยเชื้อราที่เตรียมไว้มา inoculate ตรงกึ่งกลางด้านของ agar block ทั้ง 4 ด้าน โดย sterile technique
5. ใช้ sterile forceps คีบ cover glass ที่เตรียมไว้ใน petridish วางลงบน agar block
6. เท sterile distilled water ลงใน petridish เพื่อให้ความชื้นแก่เชื้อราโดยพยายามอย่าให้ท่วมแผ่น glass slide
7. ปิดฝา petridish แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิห้อง 1-3 สัปดาห์
8. คอยสังเกตดูการเจริญของเชื้อรา จนกว่า mycelium และสปอร์จะขึ้นเต็ม cover glass
9. mount slide ดังการทดลองที่ 4.1

ปฏิบัติการที่ 12
การพิสูจน์ชนิดของยีสต์
(Identification of yeast cell)

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

ปฏิบัติการที่ 12.1 Gram's staining of yeast cell

จุดประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะในการย้อมสีแกรม และศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ ทาง microscopic เมื่อย้อมด้วยสีแกรม

อุปกรณ์

1. เชื้อยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ชุดย้อมสีแกรม
3. normal saline solution (NSS)
4. เข็มเขี่ยเชื้อรา
5. glass slide

วิธีทำ

1. หยด NSS 1 หยด ลงบน glass slide
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา เขี่ยโคโลนีของยีสต์มาเกลี่ยลงบนหยด NSS เป็นฟิล์มบาง ๆ แล้วปล่อยให้แห้ง
3. นำไปผ่านเปลวไฟเพื่อ fix เชื้อ 2-3 ครั้ง
4. ทำการย้อมสีแกรม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้
   - 4.1 หยด crystal violet ให้ท่วมบริเวณเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
   - 4.2 หยด Gram's iodine ให้ท่วมบริเวณเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
   - 4.3 decolorize ด้วย 95% alcohol นาน 15-30 วินาที แล้วล้างออกด้วย
   - 4.4 counter stain ด้วย safranin นาน 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้งหรือซับเบา ๆ ด้วยกระดาษทิชชู
   - 4.5 นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ปฏิบัติการที่ 12.2 India Ink preparation for demonstration of Cryptococcal capsul

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะในการย้อมด้วย india ink และศึกษาลักษณะแคปซูลของ *Cryptococcus neoformans* เมื่อย้อมด้วย india ink

อุปกรณ์

1. เชื้อ *Cryptococcus neoformans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. หมึก india ink (หรือ nigrosin)
3. glass slide พร้อม cover glass
4. เข็มเขี่ยเชื้อรา
5. normal saline solution (NSS)

วิธีทำ

1. หยด NSS 1 หยด ลงบน glass slide
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรามาเกลี่ยลงบนหยด NSS ให้เชื้อกระจายตัว
3. หยด india ink ลงช้า ๆ หยดเชื้อ 1 หยด
4. ปิดด้วย cover glass ปล่อยให้เชื้อและสีแพร่เข้าหากัน
5. นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์
6. ศึกษาลักษณะแคปซูลของเชื้อและบันทึกผล

ปฏิบัติการที่ 12.3 Germ tube formation of *Candida albicans*

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะในการทำ germ tube formation เพื่อประโยชน์ในการพิสูจน์เชื้อ *Candida albicans*

อุปกรณ์

1. เชื้อ *Candida albicans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. plasma tube ซึ่งผ่านการ sterile แล้ว
3. slide และ cover glass

วิธีทำ

1. inoculate เชื้อ *Candida albicans* ลงใน plasma tube โดย sterile technique
2. นำไป incubate muj 37 องศาเซลเซียส incubator นาน 2-3 ชม.

3. จากนั้น หยด plasma ลงบนแผ่นสไลด์สะอาด 1 หยด แล้วปิดทับด้วย cover glass นำไปตรวจดูลักษณะของ germ tube ที่เชื้อสร้างขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. สไลด์ที่ใช้เสร็จแล้วให้ทิ้งลงในอ่างน้ำยาฆ่าเชื้อที่มี 5% phenol

ปฏิบัติการที่ 13
การพิสูจน์เชื้อราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์
(Identification of fungi by microscopic examination)

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

ปฏิบัติการที่ 13.1 Slide culture mounting technique

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการ mount สไลด์หลังจากการเพาะเชื้อราด้วยวิธี slide culture technique

อุปกรณ์

1. เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อบน slide culture
2. glass slide และ cover glass
3. สี Lactophenol cotton blue (LPCB)
4. เข็มเขี่ยเชื้อรา และ forceps
5. ยาทาเล็บ

วิธีทำ

1. หยดสี LPCB บนแผ่นสไลด์สะอาด 1 หยด
2. ใช้ forceps คีบ cover glass บน slide culture มาปิดทับลงบนหยด LPCB พยายามให้มีฟองอากาศน้อยที่สุด
3. ใช้เข็มเขี่ย agar block ทิ้งในน้ำยาฆ่าเชื้อ แล้วหยด LPCB ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วปิดทับด้วย cover glass
4. ซับขอบ cover glass ในกรณีที่ LPCB ล้นออกมา
5. Seal สไลด์ทั้ง 2 แผ่นที่ได้ด้วยยาทาเล็บรอบ ๆ cover glass
6. รอให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ปฏิบัติการที่ 13.2 Wet mount preparation

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการเตรียมสไลด์ด้วยวิธี Wet mount preparation เพื่อนำไปศึกษาทาง microscopic

อุปกรณ์

1. สไลด์ และ cover glass
2. LPCB
3. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีทำ

1. หยดสี LPCB ลงบนแผ่นสไลด์
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา เขี่ยเชื้อราที่เตรียมไว้ เกลี่ยลงบนหยด LPCB ด้วยวิธี sterile technique
3. ปิดด้วย cover glass
4. นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ปฏิบัติการที่ 13.3 Scott tape technique

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาฝึกทักษะการเตรียมสไลด์ด้วยวิธี Scott tape technique

อุปกรณ์

1. Scott tape ยาวประมาณ 3 นิ้ว
2. กรรไกร
3. Lactophenol cotton blue (LPCB)
4. Slide และ cover glass
5. เชื้อราใน petridish

วิธีทำ

1. หยด LPCB 1 หยด ลงบนสไลด์
2. ใช้นิ้วกลางและนิ้วหัวแม่มือแตะปลายเหนียวของเทปทั้ง 2 ปลาย แล้วใช้นิ้วชี้กดเทปลงไปแตะกับโคโลนีของเชื้อใน petridish เพื่อให้เชื้อติดด้านเหนียวของ scott tape ขึ้นมา จากนั้นนำเทปที่มีเชื้อนั้นไปติดลงบนหยด LPCB บนแผ่นสไลด์
3. หยด LPCB อีก 1 หยด ลงบนเทป แล้วปิดด้วย cover glass
4. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ปฏิบัติการที่ 13.4 Identification of fungi by microscopic examination

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาเรียนรู้ลักษณะเฉพาะทาง microscopic ของเชื้อราที่สำคัญ

อุปกรณ์

1. slide culture ของเชื้อราชนิดต่าง ๆ
   - *Mucor* spp.
   - *Rhizopus* spp.
   - *Aspergillus* spp.
   - *Penicillium* spp.
   - *Trichophyton* spp.
   - *Microsporum* spp.
   - *Epidermophyton floccosum*
   - *Candida albicans*
   - *Cryptococcus neoformans*

วิธีทำ

1. ศึกษาลักษณะเฉพาะทาง microscopic ของเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่ตั้งสาธิตไว้
2. บันทึกลักษณะที่สำคัญของเชื้อราที่ตั้งสาธิตไว้

ปฏิบัติการที่ 14

Identification of fungi by macroscopic examination

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษารู้จักลักษณะของเชื้อราที่สำคัญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อดูด้วยตาเปล่า

อุปกรณ์

culture ของเชื้อราชนิดต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA

- *Mucor* spp.
- *Rhizopus* spp.
- *Aspergillus* spp.
- *Penicillium* spp.
- *Trichophyton* spp.
- *Microsporum* spp.
- *Epidermophyton floccousm*
- *Candida albicans*
- *Cryptococcus neoformans*

วิธีทำ

1. ศึกษาลักษณะของโคโลนี รูปร่าง พื้นผิวของโคโลนี สีของ pigment ที่เชื้อราสร้างขึ้นทั้งด้านบน และด้านล่างของโคโลนี จากเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่จัดเตรียมไว้
2. บันทึกลักษณะที่สำคัญของเชื้อราแต่ละชนิด

ปฏิบัติการที่ 15
การศึกษาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจบางชนิด

รศ.อารินี ชัชวาลชลธีระ

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษามีทักษะเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อราจากสิ่งส่งตรวจ

อุปกรณ์

1. 20% KOH
2. forceps
3. slide และ cover glass
4. clinical specimen เช่น ผม เล็บ หรือผิวหนัง

วิธีทำ

1. หยด KOH ลงบนสไลด์ 1 หยด
2. ใช้ forceps คีบตัวอย่างวางลงบนหยด KOH
3. นำสไลด์ไปลนไฟอ่อน ๆ อย่าให้เดือด
4. ปิดด้วย cover glass
5. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
6. บันทึกผล

คำถามท้ายบท

1. วิธีแยกเชื้อราทำอย่างไรได้บ้าง
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเชื้อราคืออะไร
3. วิธีการศึกษาวินิจฉัยเชื้อรา มีกี่วิธี อะไรบ้าง
4. วิธีการเตรียมสไลด์สำหรับการศึกษาเชื้อราทาง microscopic มีกี่วิธี อะไรบ้าง
5. การป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ ทำได้อย่างไร
6. เชื้อราก่อโรค ทางการแพทย์ แบ่งออกเป็นกี่ชนิด อะไรบ้าง
7. การศึกษาทาง macroscopic ของเชื้อรา หมายถึงการศึกษาอะไรบ้าง
8. การตรวจดูการสร้าง germ tube เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้ออะไร
9. การตรวจดูแคปซูล เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้ออะไรในบทปฏิบัติการ
10. เชื้อในกลุ่ม Dermatophyte ได้แก่ เชื้อในจีนัสอะไรบ้าง
11. ลักษณะทาง macroscopic และ microscopic ของเชื้อต่อไปนี้ ที่สำคัญมีอะไรบ้าง
    - *Mucor* spp.
    - *Rhizopus* spp.
    - *Aspergillus* spp.
    - *Penicillium* spp.
    - *Trichophyton* spp.
    - *Microsporum* spp.
    - *Candida albicans*
    - *Cryptococcus neoformans*

ภาคผนวกท้ายบท

Lactophenol cotton blue

Phenol crystals	20.0	g.
lactic acid	20.0	ml.
Glycerol	40.0	ml.
Distilled water	20.0	ml.
Cotton blue	0.05	g.

นำผลึกของ phenol ละลายในน้ำ แล้วเติม lactic acid คนให้เข้ากันจนละลาย ใช้ความร้อนพออุ่น ๆ จากนั้นเติมสี cotton blue จนละลายเข้ากัน จึงเติม glycerol เสร็จแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

หมายเหตุ อาจใช้ Aniline blue แทน cotton blue ในปริมาณเท่ากันได้

KOH solution

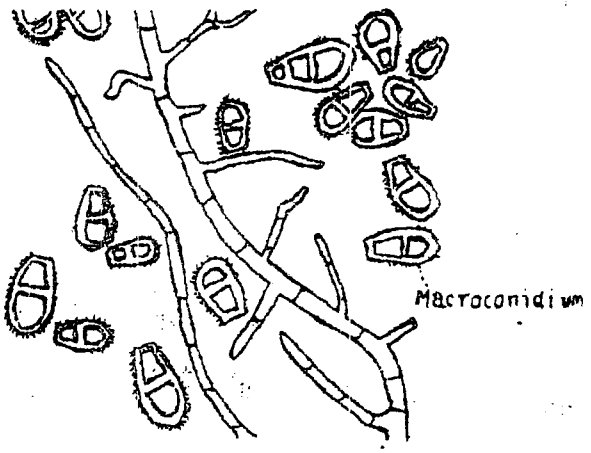
KOH	20	g.
glycerol	20	g.
distilled water	80	ml.

Sabouraud dextrose agar

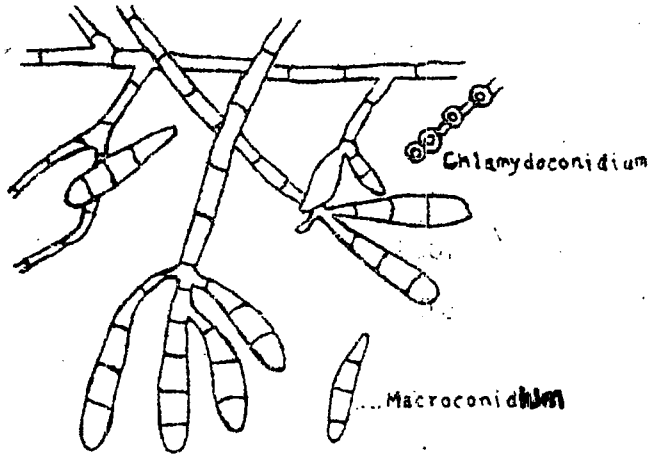
glucose	40	g.
Neopeptone	10	g.
Agar	15	g.
distilled water	1000	ml.
pH	5.6	

รูปที่ 12 ภาพแสดงลักษณะเชื้อราชนิดต่าง ๆทางกล้องจุลทรรศน์

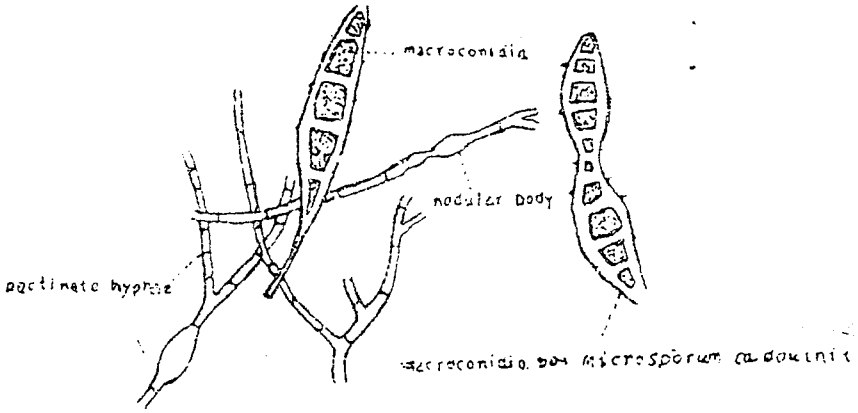
(หน้า 84 – 97)



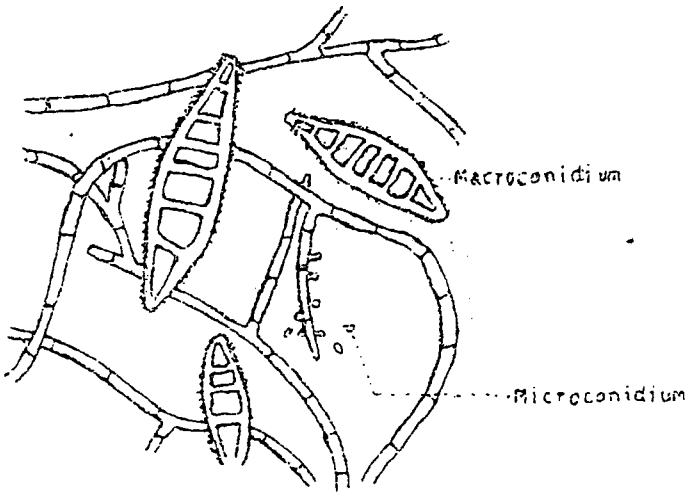
Microsporum nanum



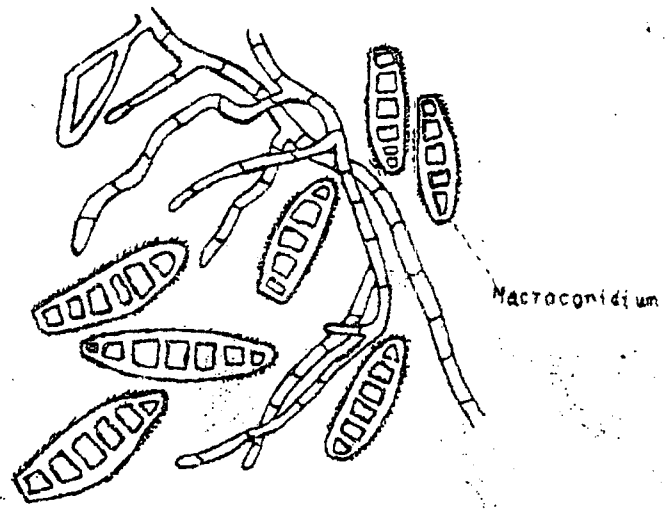
Epidermophyton floccosum



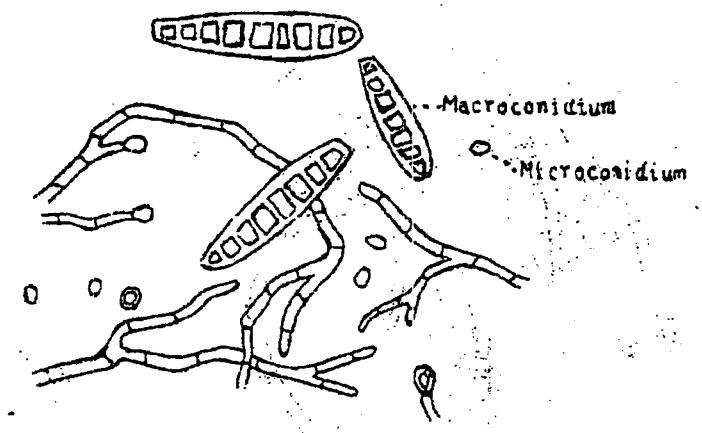
Microsporum audouinii



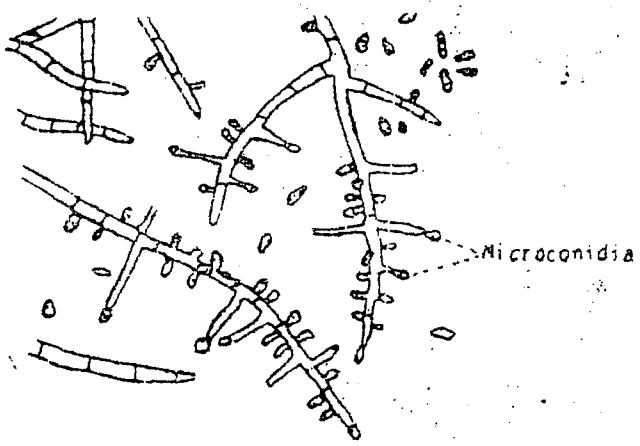
Microsporum canis



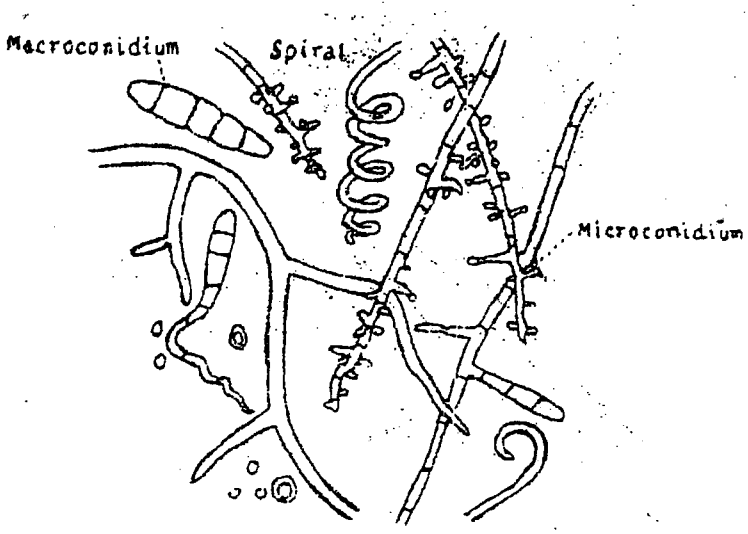
Microsporum gypseum



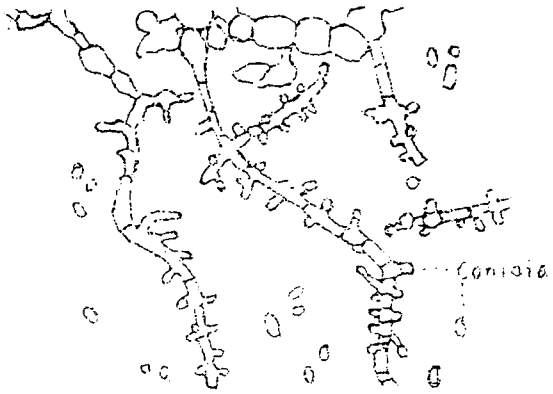
Trichophyton ajelloi



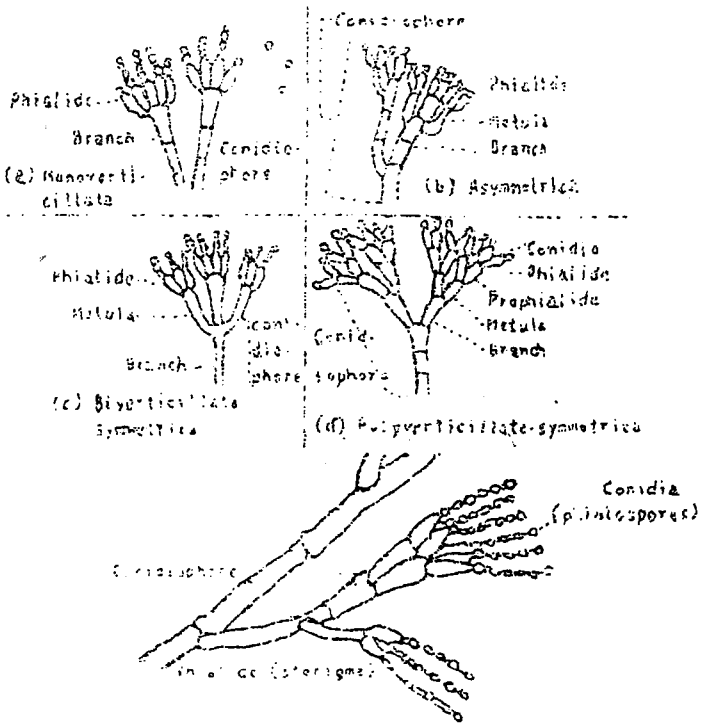
Trichophyton tonsurans



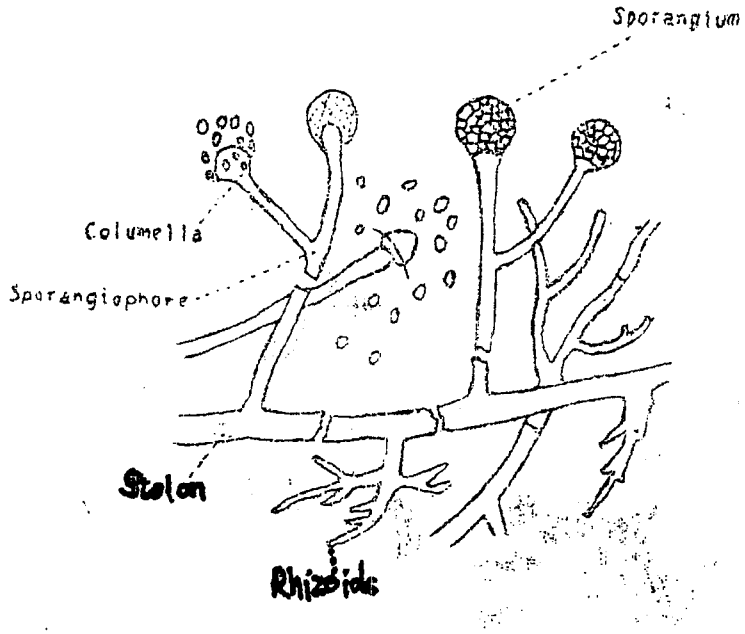
Trichophyton mentagrophytes



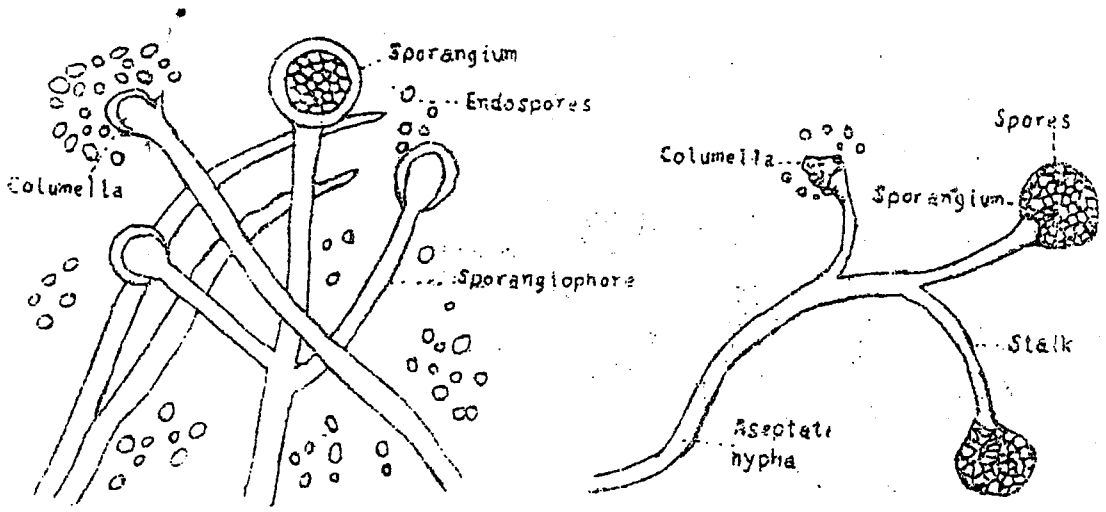
Trichophyton equinum



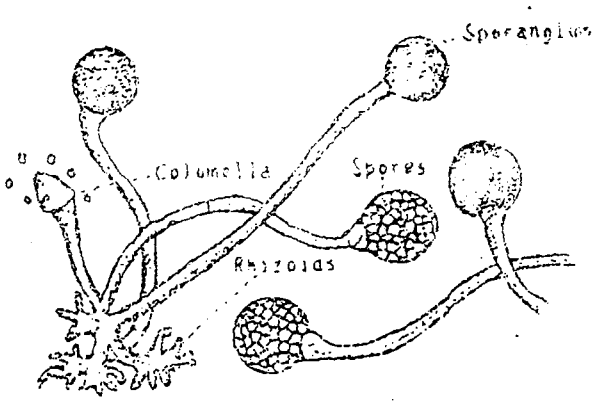
Penicillium spp.



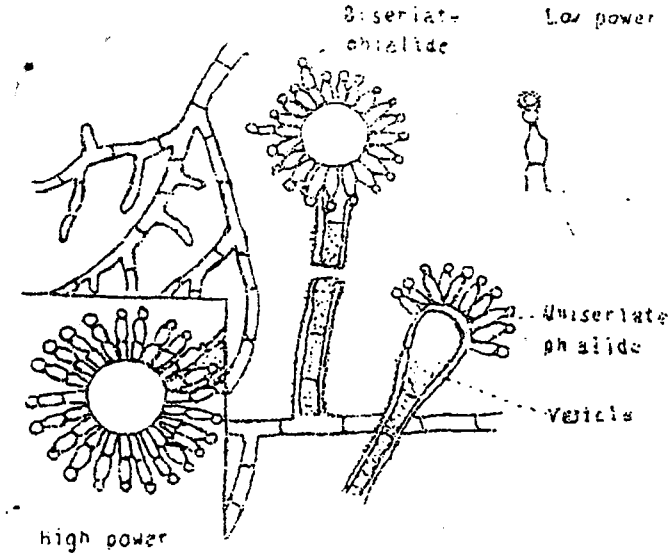
Absidia spp.



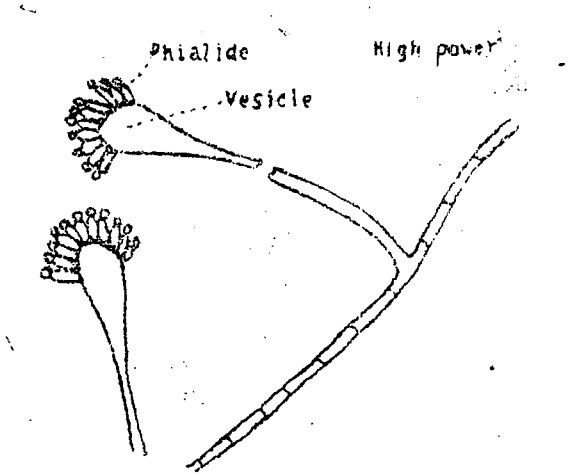
Mucor spp.



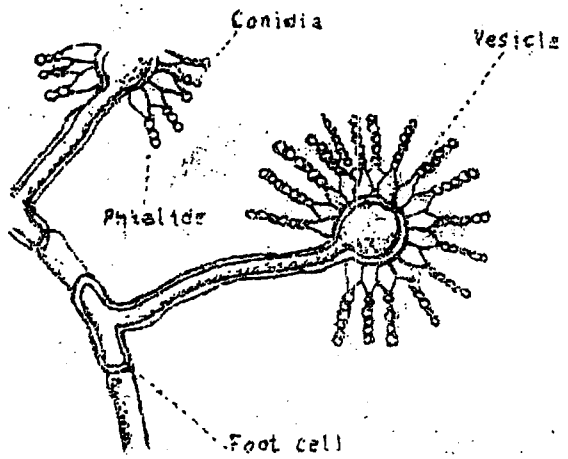
Rhizopus spp.



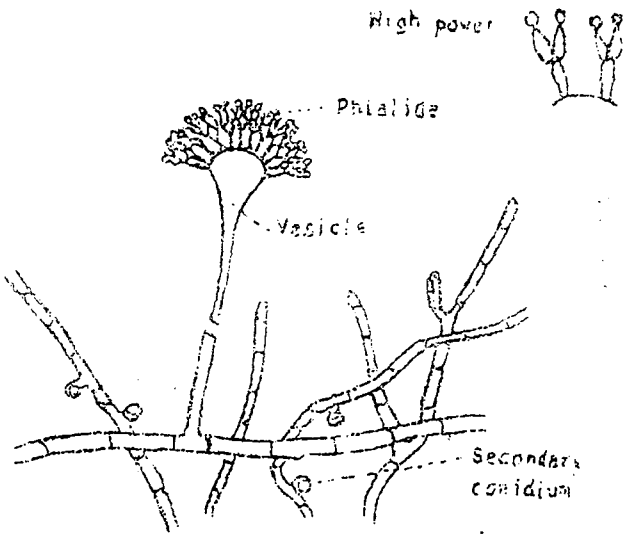
Aspergillus flavus



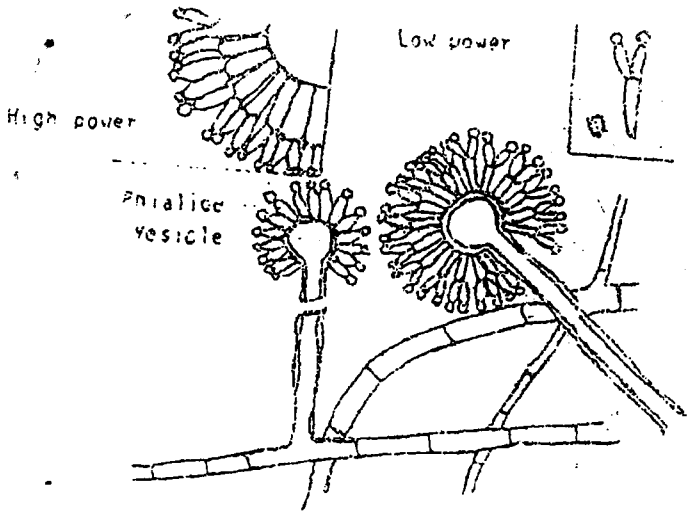
Aspergillus fumigatus



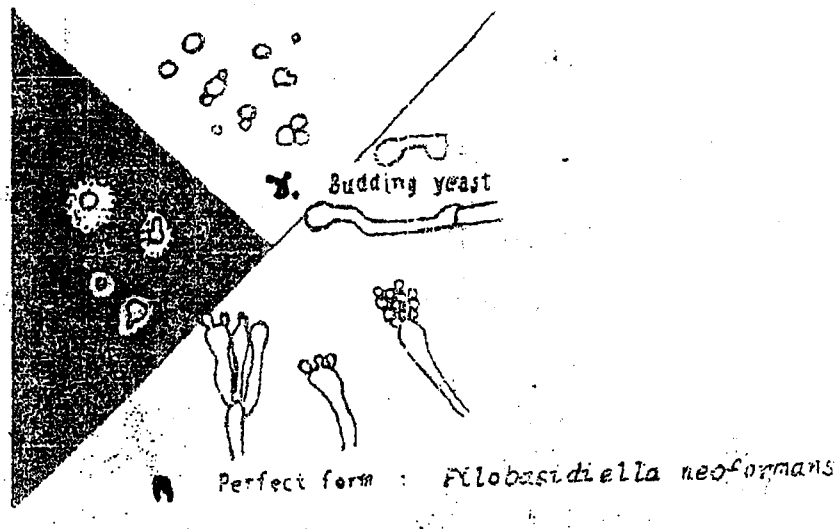
Aspergillus spp.



Aspergillus terreus



Aspergillus niger



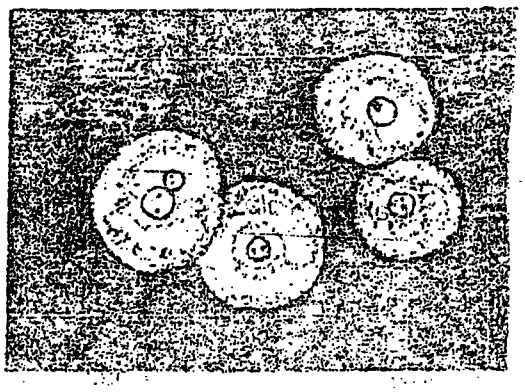
India ink preparation, showing capsule

Cryptococcus neoformans

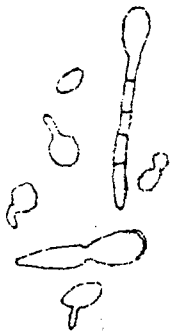
ก. ย้อมด้วย India Ink

ข. พบ budding yeast มี capsule หนามาก

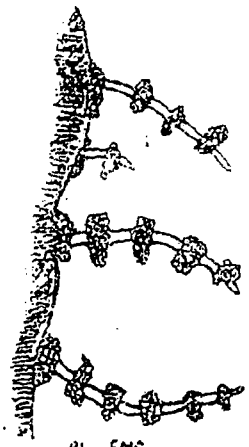
ค. Perfect form เป็น *Filobasidiella neoformans* (synonyms)



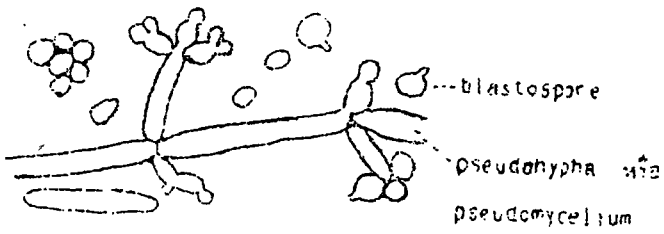
จาก India Ink Preparation ของ Spinal fluid



ก สร้าง Germ tubes



ข EMG agar at 24 hours



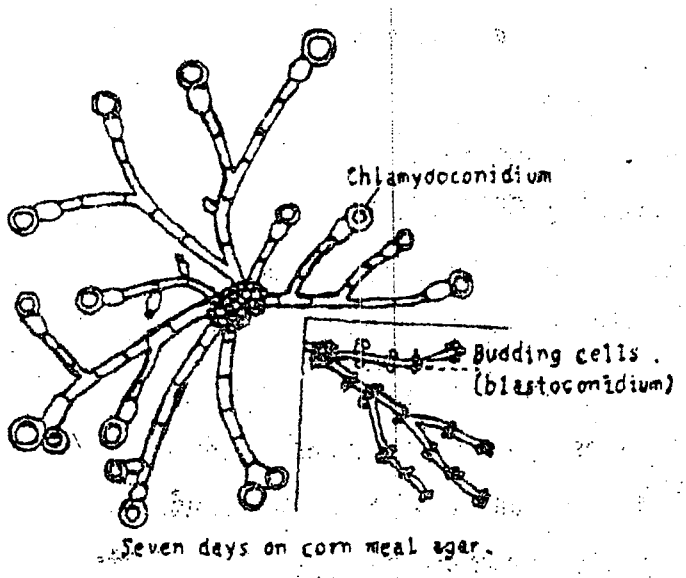
ค.

Candida albicans

ก สร้าง germ tume

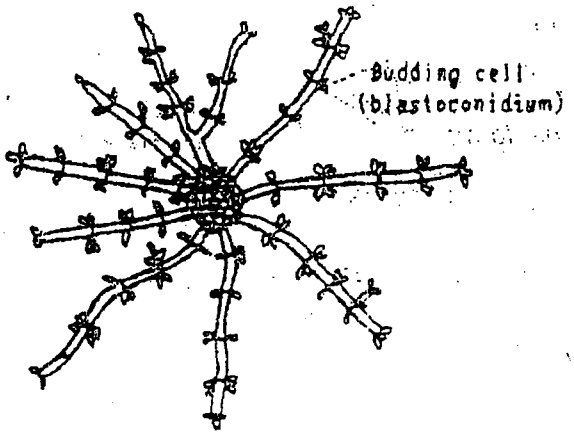
ข. จาก EMG agar สร้าง Blastospore และ Pseudohyphae (Pseudomycelium)

ค. Blastospore และ Pseudohyphae (Pseudomycelium)

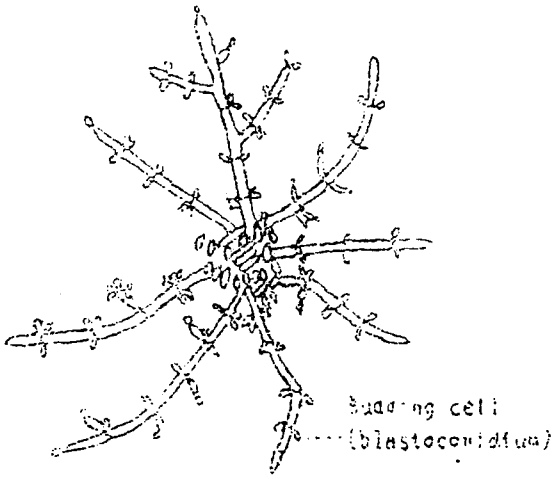


Candida albicans

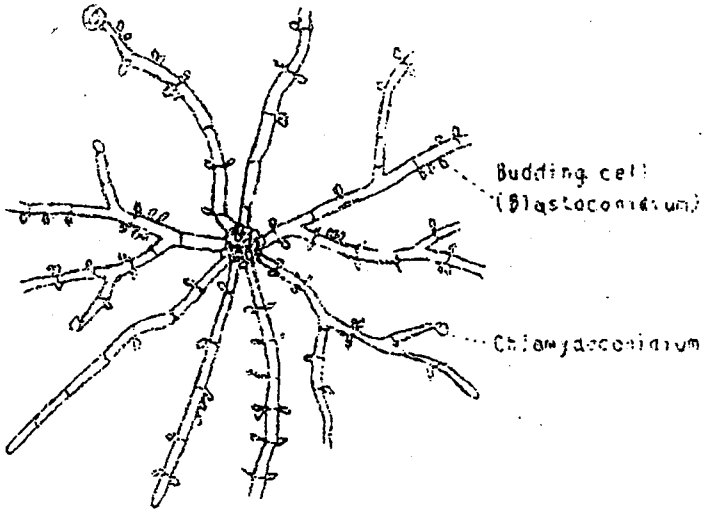
บน Corn Meal อายุ 7 วัน พบ Budding cell (Blastospore) และ pseudomycelium



Candida guillermondii



Candida pseudotropicalis



Candida tropicalis