โครงการเกษตรกู้ชาติ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ โครงการเพิ่มผลผลิตน้ำนมดิบเพื่อลดการนำเข้า

คู่มือการตรวจสอบคุณภาพน้ำนม

สุวิมล พันธุ์ดี
เอกชัย สร้อยน้ำ
โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คณะทำงาน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทวีวัฒน์ ทัศนวัฒน์	ที่ปรึกษา
คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	
อ.น.สพ.ดร.ธนู ภิญโญภูมิมินทร์	ประธาน
ผู้อำนวยการโรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ	
อ.น.สพ.เกียรติศักดิ์ ตันเจริญ	คณะทำงาน
อ.น.สพ.จตุรงค์ วงศ์สนิท	คณะทำงาน
อ.สพ.ญ.สุวิมล พันธุ์ดี	คณะทำงาน
น.สพ.ศุภชาติ ปานเนียม	คณะทำงาน
น.สพ.คมเดช จีนะเจริญ	คณะทำงาน
น.สพ.กีรติ อินทร์เอี่ยม	คณะทำงาน
น.สพ.ยุทธนา โสภี	คณะทำงาน
สพ.ญ.อรุณพรรณ ดุงสูงเนิน	คณะทำงาน
นายเอกชัย สร้อยน้ำ	คณะทำงาน
นางสาวขนิษฐา ธรรมจง	คณะทำงาน
เจ้าหน้าที่บุคลากรโรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ	คณะทำงาน

คำนำ

โครงการเพิ่มผลผลิตน้ำนมดิบเพื่อลดการนำเข้า เป็นโครงการย่อยในโครงการเกษตรกู้ชาติ มีเป้าหมายในการถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยีใหม่ ๆ ให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและผู้ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยการสนับสนุนของทบวงมหาวิทยาลัยได้รับการจัดสรรงบประมาณแผ่นดินให้นำมาปฏิบัติภารกิจที่เคยในโครงการบริการวิชาการ “เกษตรกู้ชาติ” ต่อเนื่องเป็นปีที่ 5 เพื่อขยายผลงานวิชาการสู่เกษตรกรในการช่วยฟื้นฟูเศรษฐกิจของประเทศ

เอกสารเผยแพร่วิชาการเรื่อง “คู่มือการตรวจสอบคุณภาพน้ำนม” จัดทำขึ้นโดยคณะทำงานด้านโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีความรู้และประสบการณ์จากการปฏิบัติงานอย่างใกล้ชิดกับเกษตรกรในพื้นที่ โดยเฉพาะพื้นที่การเลี้ยงโคนมในเขตภาคตะวันตกของประเทศได้แก่ ราชบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารวิชาการฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ยิ่งสำหรับผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะผู้ปฏิบัติงานในส่วนของการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการมีส่วนร่วมรับผิดชอบคุณภาพชีวิตของผู้บริโภคภายในประเทศไทยของเรา

รองศาสตราจารย์ วิโรจ อิ่มพิทักษ์
อธิการบดี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบว่าคุณภาพน้ำนมดิบที่ผลิตได้จากฟาร์มโคนมมีคุณภาพดีหรือไม่ ก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญบริโภคต่อไป โดยทำการตรวจสอบโดยห้องปฏิบัติการของศูนย์รวมน้ำนมดิบของสหกรณ์หรือบริษัทเอกชน เป็นการคัดกรองน้ำนมดิบคุณภาพดีและยังผลต่อราคาน้ำนมดิบที่เหมาะสม

นอกจากนี้การตรวจสอบคุณภาพน้ำนม ผลที่ได้จากการตรวจสอบบางครั้งยังใช้เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังปัญหาการผลิตคุณภาพน้ำนมดิบต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในระดับฟาร์มและศูนย์รวมน้ำนมดิบ นำไปสู่กระบวนการหาแนวทางในการแก้ไขและป้องกันต่อไปในอนาคต เพื่อประโยชน์สูงสุดสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม และผู้เกี่ยวข้องอื่นโดยเฉพาะผู้บริโภค

คณะผู้ทำงานด้านโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล็งเห็นความสำคัญด้านการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ จึงได้จัดทำเอกสารฉบับนี้ขึ้นเพื่อเผยแพร่ความรู้แก่ผู้สนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ ได้รวบรวมวิธีการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบหลายวิธี แตกต่างตามวัตถุประสงค์การตรวจ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพน้ำนม

คณะผู้จัดทำ

สิงหาคม 2546

สารบัญ

	หน้า
การตรวจสอบคุณภาพน้ำนม	1
วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนม	3
ตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์	
Alcohol Test	6
Alizarin Alcohol Test	7
Clot On Boiling	9
การทดสอบความเป็นกรดในน้ำนม	
โดยวิธีไตรเตรชั่น (Tritration)	10
โดยใช้ pH Meter	11
Dye Reduction Test	
Methylene Blue Reduction Test	12
Resazurin Reduction Test	15
การตรวจนับแบคทีเรียในน้ำนม	
(Total plate count or standard plate count)	18
การเพาะเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม	
(Bacterial culture and Identification)	27
การทดสอบความไวของยา	
(Antimicrobial Susceptibility Testing)	57
การตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนม	
โดย โยเกิร์ตเทสต์ KU-NP-Ab1	67
การตรวจหาปริมาณไขมันน้ำนม (Milk fat)	
โดย Gerber Butterfat Test	69
เอกสารอ้างอิง	73

การตรวจสอบคุณภาพน้ำนม

การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมในเอกสารฉบับนี้ เรียบเรียงเพื่อเป็นคู่มือการตรวจสอบคุณภาพในห้องปฏิบัติการ เหมาะสำหรับผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการ

แบ่งตามวัตถุประสงค์ใหญ่ ๆ 3 ประการคือ

1. การตรวจคุณภาพน้ำนมในเบื้องต้น(Screening Test) เพื่อแยกคุณภาพน้ำนมที่ดี ออกจากน้ำนมที่ไม่มีคุณภาพ ได้แก่

- ตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์(Alcohol Precipitation)
- Clot-On-Boiling Test
- การทดสอบความเป็นกรดในน้ำนม(Acidity Test)
- Dye Reduction Test

2. การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมในด้านสุขศาสตร์น้ำนม โดยการตรวจหาเชื้อจุลชีพโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบของแม่โครวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลงไปในถังน้ำนมรวมระหว่างการรีดนมเนื่องจากมีการจัดการการรีดนมที่ไม่ถูกอนามัย นอกจากนี้ยังรวมถึงการทดสอบความไวของยาเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาที่เหมาะสมที่สุดในการรักษาโรคเต้านมอักเสบและการตรวจหายาปฏิชีวนะที่ปนเปื้อนหรือตกค้างในน้ำนมโค ซึ่งช่วยลดปัญหาในการเกิดเชื้อดื้อยาอันอาจจะเป็นปัญหาด้านสุขภาพต่อผู้บริโภค ได้แก่

- การตรวจนับแบคทีเรียในน้ำนม(Total plate count or standard plate count)
- การเพาะเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม(Bacterial Culture and Identification)
- การตรวจนับแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์(Direct Microscopic Method)
- การทดสอบความไวของยา(Antimicrobial Susceptibility Testing)
- การตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคด้วยวิธี โยเกิร์ตเทสต์ KU-NP-Ab1

3. การตรวจหาส่วนประกอบน้ำนม ได้แก่ การตรวจหาปริมาณไขมันน้ำนม(Milk fat) โดยวิธี Gerber Butterfat เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อนและใช้เวลาไม่มากนัก ส่วนองค์ประกอบน้ำนมอื่น ๆ เช่น โปรตีน(Protein) ของแข็งทั้งหมดในน้ำนม(Total solid; TS) และของแข็งไม่รวมไขมันนม(Solid not fat; SNF) ค่อนข้างซับซ้อนและใช้เวลานานไม่เหมาะสมในการตรวจในห้องปฏิบัติการในระดับสหกรณ์ อย่างไรก็ตามองค์ประกอบน้ำนม สามารถตรวจโดยใช้เครื่องตรวจส่วนประกอบน้ำนมได้ในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีเครื่องตรวจเซลล์โซมาติก (Somatic cell count) แต่เครื่องตรวจนี้มีราคาค่อนข้างแพง อย่างไรก็ตามเกษตรกรสามารถส่งตัวอย่างน้ำนมไปตรวจได้ที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยีและสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ซึ่งหน่วยงานดังกล่าวขึ้นอยู่กับกรมปศุสัตว์สามารถสอบถามรายละเอียดได้ที่หมายเลข 0-2653-4444 และ 0-2501-1216

นอกจากนี้ได้รวบรวมวิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนม ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่ไม่ควรมองข้าม เพราะหากเก็บตัวอย่างไม่ถูกต้อง ตัวอย่างน้ำนมนั้นจะมิใช่ตัวแทนของน้ำนมของโคนมหรือฟาร์มนั้น เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์หรือแปลผลที่ถูกต้องได้

หากต้องการทราบรายละเอียดที่นอกเหนือจากคู่มือฉบับนี้ หาข้อมูลเพิ่มเติมได้จากเอกสารอ้างอิงท้ายเล่ม หรือสามารถขอคำแนะนำได้จากหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ

วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำนม

การเก็บตัวอย่างน้ำนมสิ่งที่สำคัญ ต้องปฏิบัติให้ถูกต้องเพื่อตัวอย่างนั้นจะได้เป็นตัวแทนของน้ำนมจากโคหรือถังน้ำนมรวมอย่างแท้จริง

โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจวิเคราะห์ด้านแบคทีเรียต้องระวังเรื่องความสะอาดและการปนเปื้อนเชื้อจุลชีพอื่น ๆ ระหว่างทำการเก็บตัวอย่าง

อุปกรณ์การเก็บตัวอย่าง

1. หลอดเก็บตัวอย่างหรือขวดชนิดที่มีฝาปิด
2. เครื่องมือที่ใช้คน(Plunger, Aligator หรือ Dipper)
3. Rack สำหรับวางหลอดเก็บตัวอย่าง
4. สำลีแอลกอฮอล์ 70 % (70%Ethyl หรือ Isopropyalcohol)
5. ปากกากันน้ำ
6. ถุงพลาสติก(ถุงเย็น) และหนังยาง
7. กระติกน้ำแข็ง และน้ำแข็ง

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

1. การเก็บตัวอย่างจากแม่โคโดยตรง

1.1 เก็บจากภาชนะบรรจุนมของแม่โคแต่ละตัว (ถังรีดนม) ภายหลังจากรีดนมเสร็จแล้ว คนตัวอย่างน้ำนมให้เข้ากัน แล้วใช้ Dipper เก็บน้ำนม

1.2 หากต้องเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อวิเคราะห์หาเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบ มีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างดังนี้

(1) ควรเก็บตัวอย่างนมก่อนหรือหลังการรีดนมอย่างน้อย 6 ชั่งโมง ทำความสะอาดบริเวณหัวนมของเต้าที่จะเก็บตัวอย่าง โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ให้สะอาด (โดยเฉพาะบริเวณรูหัวนม) และรอให้แห้งก่อนเก็บตัวอย่าง มือของผู้ที่ทำการเก็บตัวอย่างต้องสะอาดและแห้ง

(2) รีดนมทิ้ง 2-3 สาย

(3) เปิดฝาหลอดเก็บตัวอย่างระวังอย่าให้ปากหลอดสัมผัสกับหัวนม (Teat) รีดนมเก็บใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างอย่าให้นิ้วสัมผัสกับหัวนม ปริมาณตัวอย่างน้ำนมไม่ควรเกิน 2 ใน 3 ของปริมาตรความจุของหลอด

(4) ระบุชื่อตัวอย่างให้ชัดเจน

(5) เก็บตัวอย่างนมก่อนทำการรักษา

(6) แช่ตัวอย่างนมในกระติกน้ำแข็งและส่งห้องปฏิบัติการทันที (ควรทำการวิเคราะห์ตัวอย่างนมภายใน 24 ชั่วโมง)

2. การเก็บตัวอย่างจากถังน้ำนมรวม

1. คนน้ำนมเพื่อให้ครีมกระจายไปทั่ว
2. ใช้ Dipper ตักน้ำนมใส่ขวดเก็บตัวอย่าง (ใส่นมประมาณ 3/4 ของขวดเก็บตัวอย่าง)
3. ระบุรายละเอียดตัวอย่างให้ชัดเจน แช่ตัวอย่างนมในกระติกน้ำแข็งและส่งห้องปฏิบัติการทันที (ควรทำการวิเคราะห์ตัวอย่างนมภายใน 24 ชั่วโมง)

ตรวจการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์

การตรวจตัวอย่างน้ำนมโดยดูการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ เป็นการตรวจคุณภาพน้ำนมในเบื้องต้นว่ามีคุณภาพดีหรือไม่ ซึ่งมี 2 วิธีได้แก่ Alcohol test และ Alizarin alcohol test โดยมีการทดสอบ Clot-on-boiling เป็นการยืนยันผลการทดสอบการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์

1. Alcohol Test

การทดสอบนี้สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ทำให้ทราบถึงคุณภาพน้ำนมว่าเหมาะที่จะนำไปผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์หรือขบวนการแปรรูปอื่น ๆ โดยผ่านความร้อนหรือไม่ ซึ่งเป็นการทดสอบเสถียรภาพของโปรตีนน้ำนมที่เป็นกรดเมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์จะเกิดการตกตะกอน(Precipitation) ถือว่าให้ผลบวก (Positive) แต่ถ้านมมีคุณภาพดีจะไม่เกิดการตกตะกอนขึ้น

วิธีนี้มีข้อพึงระวังดังนี้

1. ถ้าใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะเกิดปฏิกิริยาช้า แต่ถ้าใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงจะให้ผลไม่แน่นอน(False positive)
2. น้ำนมเหลือง (Colostrum) และน้ำนมจากเต้านมอักเสบ (Mastitis) จะให้ผลบวก

อุปกรณ์และสารเคมี

1. 68% Ethanol

เตรียมโดยใช้ 95% Ethanol (Absolute) ผสมกับน้ำกลั่น เช่น ถ้าต้องการ 68% Ethanol 1 ลิตร เตรียมได้โดยคำนวณจากสูตร M1V1 = M2V2

M1	=	ความเข้มข้นของสารละลายตั้งต้น ซึ่งก็คือ 95 (95% Ethanol)
M2	=	ความเข้มข้นใหม่ของสารละลายที่ต้องการ ณ ที่นี้คือ 68 (68% Ehtonol)
V1	=	ปริมาตรของสารละลายตั้งต้นที่ต้องการใช้ (เป็นค่าที่ต้องคำนวณ)
V2	=	ปริมาตรของสารละลายใหม่ที่ต้องการนั่นคือ 1 ลิตร หรือ 1,000 มิลลิลิตร

แทนค่าในสูตร

$$M1V1 = M2V2$$

$$95\ V1 = 68 \times 1{,}000$$

$$V1 = \frac{68 \times 1{,}000}{95}$$

$$= 715.80$$

ดังนั้น ต้องตวงปริมาตร 95% Ethanol 715.80 ml จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 1,000 ml สารละลายที่ได้ก็คือ 68% Ethanol

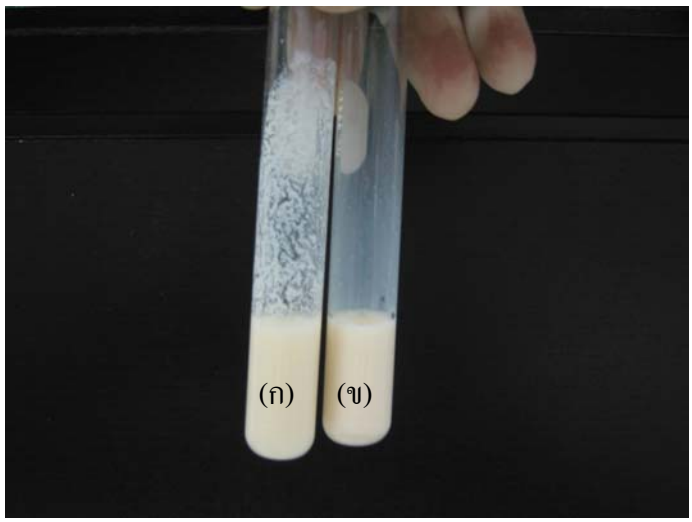
หมายเหตุ สามารถใช้หลักการคำนวณนี้ใช้ในการเตรียมสารละลายอื่น ๆ ได้

2. หลอดแก้ว (Test tube)
3. Pipette ขนาด 1, 10 ml
4. Rack ใส่หลอดแก้ว

วิธีการทดสอบ

ใช้ Pipette ดูดตัวอย่างนม และ 68% Ethanol ในปริมาตรเท่ากัน (1:1) คนให้เข้ากัน ถ้าสงสัยว่าให้ผลบวก ลองทำการตรวจซ้ำด้วย Clot-on-boiling test

ดูดตัวอย่างน้ำนม และ แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1



เปรียบเทียบตัวอย่างที่ให้ผลบวก(Positive) และผลลบ(Negative)

(ก) นมที่มาจากโคที่เป็นเต้านมอักเสบพบตะกอนจะให้ผลบวก (Positive)

(ข) นมคุณภาพดีไม่พบตะกอนจะให้ผลลบ (Negative)

2. Alizarin Alcohol Test

เป็นการทดสอบเหมือน Alcohol Test แต่เติมสีคือ Alizarin ซึ่งเปลี่ยนไปตามสภาพความเป็นกรด (Color Indicator) ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนขึ้น

วิธีการเตรียม Alizarin Alcohol Solution

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Alizarin powder 2 g.
2. 68 % Alcohol
3. 0.1 N Na_2CO_3 หรือ 0.1 N HCl หรือ 0.1N NaOH หรือ 0.1 N H_2SO_4
4. กระดาษกรอง
5. Flask ขนาด 1.5 L
6. หลอดแก้ว (Test Tube)
7. Rack ใส่หลอดแก้ว

การเตรียม

Alizarin powder 2 g. ใส่ลงใน Flask ที่มี 68 % Alcohol 1,000 ml เขย่าให้ Alizarin powder ละลาย กรองเอากาศออก ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ปรับ pH ด้วย 0.1 N Na_2CO_3 หรือ 0.1 N HCl หรือ 0.1 NaOH หรือ 0.1 N H_2SO_4 ให้ได้ pH 5.8-6.3

วิธีทดสอบ

ทำเช่นเดียวกับ Alcohol test

การอ่านผล

สีที่เกิดขึ้นจะจางหรือเข้มขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดในน้ำนมนั้น

- pH 6.6-6.7 น้ำนมปกติ จะให้สีน้ำตาลแดง และไม่เกิดตะกอนหรือลิ่ม
- pH 6.4-6.6 น้ำนมเป็นกรดเล็กน้อย จะให้สีน้ำตาลออกเหลืองและไม่เกิดตะกอนหรือลิ่ม
- pH 6.3 หรือต่ำกว่า น้ำนมเป็นกรดมาก จะให้สีเหลืองและเกิดตะกอนหรือเป็นลิ่ม
- pH 6.8 หรือสูงกว่า น้ำนมเป็นด่าง จะให้สีม่วง ซึ่งอาจเป็นน้ำนมที่ได้จากโคที่เป็นเต้านมอักเสบ และพบการตกตะกอน

Parameter	Normal milk	Slightly acid milk	Acid Milk	Alkaline milk
pH	6.6-6.7	6.4-6.6	6.3 or Lower	6.8 or higher
Colour	Red brown	Yellowish-brown	Yellowish	Liac
Appearance of milk	No coagulation no lump	No coagulation	coagulation	coagulation

Clot-On-Boiling Test (COB)

เป็นวิธีที่ใช้ยืนยันผลการตรวจด้วย Alcohol test ถ้าน้ำนมดิบมีคุณภาพดีจะไม่ตกตะกอนเมื่อนำไปต้ม แต่ถ้าน้ำนมมี pH < 5.4 เมื่อผ่านความร้อนจะจับกันเป็นก้อนซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก

1. มีการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดได้(Rennet producing bacteria)
2. นมที่มี% โปรตีนสูง เช่น น้ำนมเหลือง(Colostrum)
3. มีความเข้มข้นของเกลือมากเนื่องจากรีดนมจากโคที่เกิดเต้านมอักเสบ

ดังนั้นการทดสอบ COB นี้ จึงเป็นการทดสอบน้ำนมดิบว่าเหมาะสมที่จะนำไปแปรรูปหรือไม่

อุปกรณ์

1. หลอดแก้วขนาดความจุ 10 ml พร้อมฝาจุก
2. Pipette ขนาด 5 ml
3. ตะแกรงสำหรับเรียงหลอดแก้ว(Rack)
4. Water bath 100 ^{0}C หรือ ใช้ภาชนะที่สามารถวาง Rack ได้ ต้มน้ำให้เดือด

วิธีทดสอบ

1. ดูดตัวอย่างนม 5 ml ใส่ในหลอดแก้ว
2. เรียงตัวอย่างในตะแกรง และนำไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 100 ^{0}C หรือในภาชนะที่มีน้ำเดือด นาน 5 นาที ให้ระดับน้ำสูงกว่าตัวอย่างนมในหลอด
3. เช็ดด้านนอกของหลอดให้แห้ง ค่อย ๆ เอียงหลอดช้า ๆ สังเกตตะกอนที่ผนังด้านในหลอด

ผลการทดสอบ

น้ำนมที่จับตัวกันเป็นก้อน(Curdling or clotting) ให้รายงานผลเป็นบวก แสดงว่าน้ำนมนั้นเกิดกรดขึ้นไม่เหมาะที่จะมาทำผลิตภัณฑ์ประเภทที่ต้องผ่านขบวนการความร้อน(Heat processing milk) เช่น ขบวนการพาสเจอร์ไรซ์

นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที

นมที่ให้ผลบวก สังเกตที่ข้างหลอดจะพบนมจับตัวกันเป็นก้อน

นมที่มีคุณภาพดีเมื่อผ่านความร้อนแล้วไม่จับตัวกันเป็นก้อน

การทดสอบความเป็นกรดในน้ำนม

เป็นอีกดรรชนีหนึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำนมว่ามีความเหมาะสมในการแปรรูปด้วยระดับความร้อนต่างๆ หรือไม่ น้ำนมที่มีคุณภาพดีจะมีค่าความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 0.16-0.18 % (โดยการทดสอบด้วยวิธีไตเตรชั่น) หรือ pH 6.6-6.9 (โดยวัด pH meter) หากพบว่ามีค่าความเป็นกรดสูงกว่าปกติ จะมีผลต่อความสามารถในการทนความร้อน(Heat stability) เมื่อนำน้ำนมที่เป็นกรดสูงไปผ่านขบวนการความร้อน โปรตีนนมถูกทำลายได้ง่ายและจะจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งความเป็นกรดที่สูงกว่าปกตินี้ มักเกิดจากการที่น้ำนมมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่มีการใช้น้ำตาลในนม (Lactose) เกิดการสร้าง Lactic acid

การทดสอบความเป็นกรดนี้มีวิธีการทดสอบดังนี้

1. โดยวิธีไตเตรชั่น (Titration)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml
2. Pipette ขนาด 1 และ 10 ml
3. Burette
4. แท่งแก้ว (glass rod) สำหรับใช้คน
5. 1 % Phenophtalein : ชั่ง Phenophtalein 1 g ละลายใน 95% Ethanol 50 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml
6. 0.1 N NaOH

วิธีทดสอบ

1. ใช้ Pipette ดูดตัวอย่างน้ำนมที่เขย่าหรือคนให้เข้ากันดีแล้ว 9 ml ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 ml
2. เติม 10 หยด 1% Phenophtalein
3. เติม 0.1 N NaOH ลงใน 0.1 ml Burette ปรับพร้อมที่จะใช้ให้อยู่ที่ขีด 0
4. เขย่า Erlenmeyer flask ตลอดเวลา เติม 0.1 N NaOH จาก Burette ช้า ๆ ทีละหยด จนเกิดเป็นสีชมพูอ่อน ๆ ขึ้น
5. ให้ดูว่าใช้ 0.1 N NaOH ไปเท่าใดให้นำไปคำนวณค่าความเป็นกรดต่อไป

สูตรคำนวณค่าความเป็นกรด

$$\%\ \text{Lactic acid} = \frac{\text{ปริมาตรของ 0.1 n NaOH(ml)} \times 0.009 \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)}}$$

2. โดยใช้ pH meter

อุปกรณ์และสารเคมี

1. pH meter
2. Standard Buffer pH 4.0, pH 7.0

วิธีทดสอบ

1. Standardize pH meter ด้วย Standard Buffer pH4.0, pH 7.0
2. เตรียมตัวอย่างน้ำนมโดยเขย่าให้เข้ากันดีและมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง
3. ใช้ Probe ของ pH meter จุ่มที่ตัวอย่างทิ้งไว้จนค่าของ pH นิ่งแล้วจึงอ่านค่า
4. เมื่อจะวัดตัวอย่างอื่นให้ล้าง Probe ด้วยน้ำกลั่นก่อนวัด

pH Meter

น้ำนมปกติมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกลาง คืออยู่ที่ค่าระหว่าง 6.6-6.9

Dye Reduction Test

หลักการ เป็นการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นโดยมีเอนไซม์รีดั๊กเทส(reductase) ของแบคทีเรีย แบคทีเรียจะใช้ออกซิเจนจากสารละลายเมธิลลีนบลู ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากเมธิลลีนบลูสีน้ำเงิน หรือฟ้าเป็นลิวโคเมธิลลีนบลูซึ่งมีสีขาว ส่วนรีซาซูรินมีสีม่วงน้ำเงิน เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น จะเปลี่ยนเป็นรีโซรูฟิน ซึ่งมีสีชมพู และเมื่อปฏิกิริยายังดำเนินต่อไปจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรรีโซฟูริน ซึ่งมีสีขาว

1. Methylene Blue Reduction Test

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Methylene Blue Thiocyanate ชนิดเม็ด
2. Sterile distilled water
3. Flask
4. หลอดแก้ว(Test tube) พร้อม ฝาปิด
5. Pipette
6. Water bath
7. Rack ใส่หลอดทดสอบ
8. นม UHT หรือนมพาสเจอร์ไรซ์ สำหรับเตรียมตัวอย่างควบคุม

วิธีการเตรียมสารเคมี

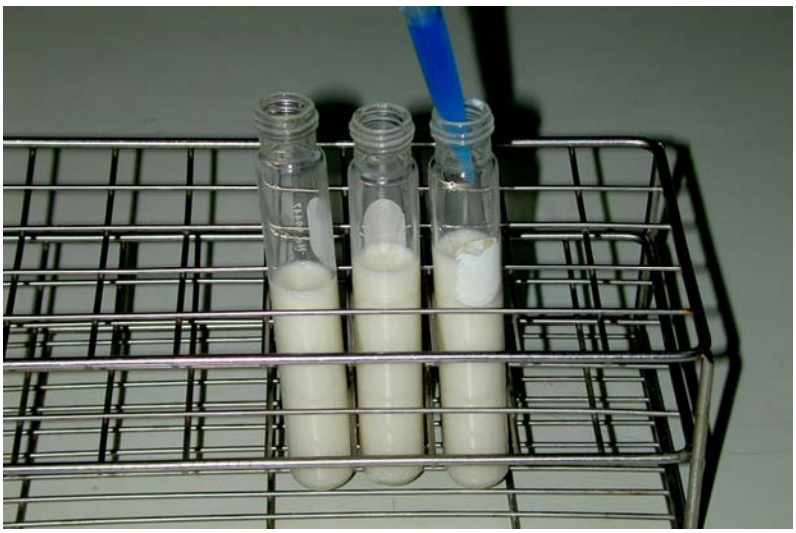
ละลาย Methylene Blue Thiocyanate 1 เม็ดในน้ำที่อบฆ่าเชื้อหรือน้ำที่ต้มเดือด 200 ml ใน Flask ที่สามารถป้องกันแสงได้ (อาจใช้ขวดสีชา หรือใช้แผ่นอลูมิเนียม ฟอยล์หุ้มขวด) ต้องแน่ใจว่าละลายดีแล้วจากนั้นเติมน้ำอีก 3 เท่า จะได้สารละลายทั้งหมด 800 ml

หมายเหตุ : สารละลายที่เตรียมนี้ ควรใช้ภายใน 1 เดือน

สารละลาย Methylene blue ที่เตรียมไว้ในขวดสีชา

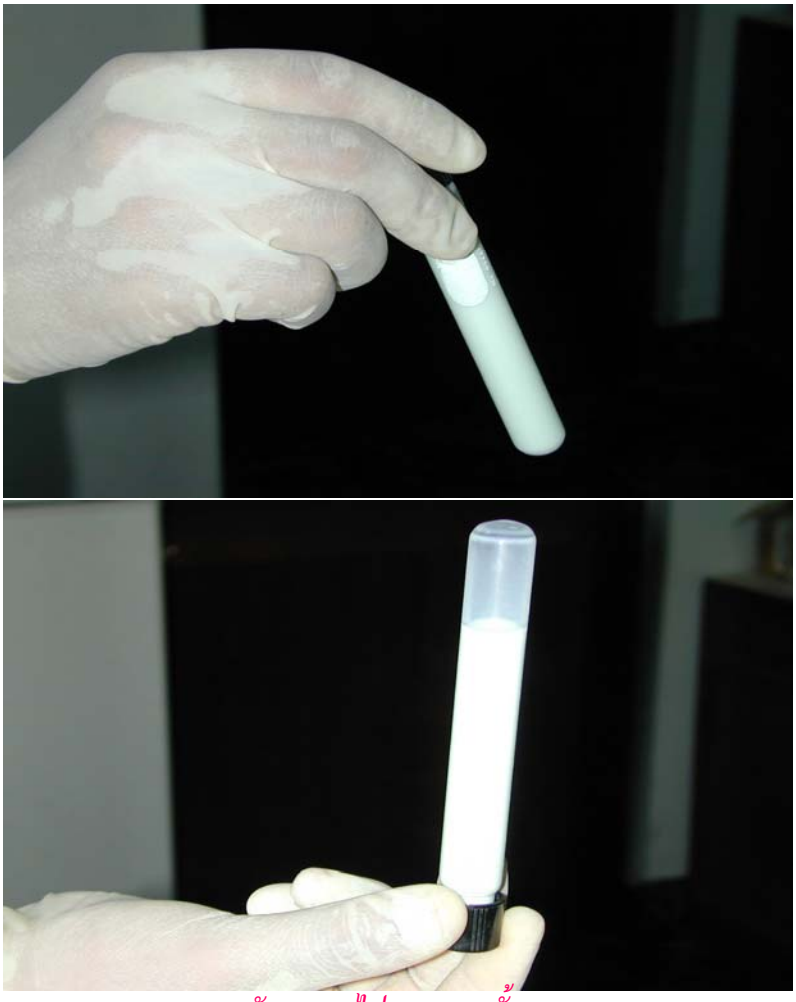
ขั้นตอนการทดสอบ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบต้องนึ่งหรือต้มฆ่าเชื้อ และไม่มีสารเคมีตกค้าง
2. ดูดสารละลาย Methylene BlueThiocyanate 1 ml ใส่ในหลอดทดสอบที่ใส่ตัวอย่างน้ำนม 10 ml



ดูดสารละลาย Methylene Blue 1 ml ใส่ลงในตัวอย่างนม

3. กลับหลอดไปมาช้าๆ 2-3 ครั้ง **(ห้ามเขย่าหลอดโดยเด็ดขาด)**



กลับหลอดไปมา 2- 3 ครั้ง

4. แช่ตัวอย่างน้ำนมใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C บันทึกเวลาที่เริ่มแช่และบันทึกผลครั้งแรกในนาทีที่ 30 ชั่วโมงที่ 1, 2 ไปเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 6 (อาจดูผลถึงชั่วโมงที่ 8) กลับหลอดทุกครั้งที่อ่านผลในแต่ละชั่วโมง

แช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C

4. บันทึกเวลาของตัวอย่างน้ำนมที่เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีขาว บันทึกว่าเป็นบวก (Positive)

ในการทดสอบตัวอย่างทุกครั้งต้องมีตัวอย่างควบคุม(Control) ทั้งตัวอย่างควบคุมบวก(Positive Control) และตัวอย่างควบคุมลบ(Negative Control)

การเตรียมตัวอย่างควบคุมมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัวอย่างควบคุมบวก(Positive Control)

ใช้ Pipette 10 ml ดูดนม UHT 10 ml ใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย Methylene Blue 1 ml กลับหลอดไปมาผสมให้เข้ากันดี

2. ตัวอย่างควบคุมลบ(Negative Control) ใช้ Pipette 10 ml ดูดนม UHT 10 ml ใส่ในหลอดทดสอบที่ไม่ใส่สารละลาย Methylene Blue

3. แช่หลอดควบคุมพร้อมกับหลอดตัวอย่างที่ทดสอบ

การแปรผล

สีไม่เปลี่ยนแปลงมากกว่า 8 ชั่วโมง	=	น้ำนมเกรด 1 มีคุณภาพเยี่ยม(Excellent)
สีเปลี่ยนแปลงภายใน 6-8 ชั่วโมง	=	น้ำนมเกรด 2 มีคุณภาพ ดี(Good)
สีเปลี่ยนแปลงภายใน 2-6 ชั่วโมง	=	น้ำนมเกรด 3 มีคุณภาพพอใช้(Fair)
สีเปลี่ยนแปลงใช้เวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง	=	น้ำนมเกรด 4 ไม่มีคุณภาพ(Poor)

ตัวอย่างน้ำนมที่คุณภาพไม่ดีจะเปลี่ยนเป็นสีขาว

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบ

1. ชนิดของแบคทีเรีย

Coliform เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา หมักกับน้ำตาลแลคโตส(Lactose) เกิดปฏิกิริยารีดักชั่นได้เร็ว ได้แก่ Escherichia coli, Klebsiella และ Enterobacter spp.

Streptococcus lactis, Faecal streptococci บางชนิด และกลุ่ม micrococci เกิดปฏิกิริยารีดักชั่นได้เร็วเป็นอันดับรองลงมา ส่วน Thermoduric bacteria(แบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน) และ Psychotrophic bacteria (แบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ) เกิดปฏิกิริยาช้ามาก

2. จำนวนเม็ดเลือดขาว ซึ่งเม็ดเลือดขาวจะดึงออกซิเจนจากสารละลายเมธิลลีนบลู ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว

3. การกระจายตัวของแบคทีเรีย

บางครั้งแบคทีเรียจะเกาะอยู่ที่ ไขมันหรือครีม ซึ่งจะอยู่เฉพาะบนผิว ทำให้การเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง

2. Resazurin Reduction Test

Resazurin Reduction Test เป็นการทดสอบตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช้หลักการเดียวกันกับการทดสอบ Methylene Blue Test ที่ใช้ทดสอบมี 3 วิธีคือ 10 minute test, one-hour test และ triple-reading test วิธี 10 minute test เป็นการทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพนมเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ one-hour test และ triple-reading test จะให้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรงกว่า

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Resazurin Tablet
2. Sterile distilled water
3. Flask
4. Test tube พร้อม ฝาปิด
5. Pipette ขนาด 1 ml และ 10 ml
6. Water bath
7. Rack ใส่หลอดแก้ว
8. Lovibond comparator with Resazurin disc 4/9

วิธีการเตรียมสารเคมี

ละลาย Resazurin Tablet 1 เม็ด ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 50 ml

หมายเหตุ : สารละลายที่เตรียมนี้ ควรใช้ภายใน 1 สัปดาห์

ขั้นตอนการทดสอบ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบต้องนึ่งหรือต้มฆ่าเชื้อ และไม่มีสารเคมีตกค้าง
2. ดูดสารละลาย Resazurin dye solution 1ml ใส่ในหลอดแก้ว
3. เติมตัวอย่างนมที่จะทดสอบ 10 ml ปิดฝา กลับหลอดไปมาช้า ๆ 2-3 ครั้ง (ห้ามเขย่าหลอดโดยเด็ดขาด)
4. แช่ตัวอย่างนมใน Water bath อุณหภูมิ 37 ^{0}C
5. บันทึกเวลาที่เริ่มทดสอบ
6. ดูผลที่เวลา 10 นาที (10 minute test) หรือ 1 ชั่วโมง(One-hour test) หลังจากแช่ตัวอย่าง หรือชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 (Triple-reading test) บันทึกผล กลับหลอดไปมาทุกครั้งที่อ่านผล บันทึกเวลา

การเตรียมตัวอย่างควบคุมทำเช่นเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างควบคุมในการทดสอบ Methylene Blue Reduction Test แต่ตัวอย่างควบคุมบวกเติมสารละลาย Resazurin แทน

การแปรผล

1.	สีน้ำเงิน(Blue) ไม่เปลี่ยนสี	=	ดีเยี่ยม(Exellent)
2.	สีม่วงน้ำเงิน(Blue to deep Mauve)	=	ดี(Good)
3.	สีม่วงแดง(Deep mauve to deep pink)	=	พอใช้(Fair)
4.	สีชมพูขาว(Deep pink to whitish pink)	=	แย่(Poor)

ในการทดสอบ 10 นาที(10 minute test) อ่านผลโดยการใช้หลอดที่ทดสอบใส่ใน Lovibond Comparator ที่มี Resazurin disk โดยเทียบสีกับหลอดที่ใส่ตัวอย่างนมเดียวกันแต่ไม่ใส่สารละลาย Resazurin(Blank) อ่านผลดังตาราง

READINGS AND RESULTS (10 MINUTE RESAZURIN TEST)

Resazurin disc No.	สี	เกรดนม	การปฏิบัติ
6	สีน้ำเงิน	ดีเยี่ยม	ยอมรับ
5	สีฟ้า	ดีมาก	ยอมรับ
4	สีม่วง	ดี	ยอมรับ
3	สีชมพูม่วง	ปานกลาง	แยกออก
2	สีชมพูอ่อน	แย่	แยกออก
1	สีชมพู	แย่มาก	ไม่ยอมรับ
0	สีขาว	แย่ที่สุด	ไม่ยอมรับ

การตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนม

(Total plate count or Standard Plate Count)

เป็นการประเมินหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำนม โดยเฉพาะตัวอย่างน้ำนมรวมฟาร์มหรือน้ำนมรวมสหกรณ์ หลักการคือ นับจำนวนโคโลนีที่พบทั้งบนและในอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าที่ได้บ่งชี้ถึงความสะอาดของน้ำนมดิบซึ่งสะท้อนให้เห็น

1. ความสะอาดในการรีดนม และความสะอาดของอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการรีดนม
2. การทำความสะอาดเต้านมและหัวนมโคก่อนรีดนม
3. การรักษาความเย็นของน้ำนมหลังจากการรีด
4. ปัญหาเต้านมอักเสบ
5. น้ำนมดิบมีคุณภาพตามมาตรฐานที่จะนำไปสู่ขบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ หรือไม่

นอกจากนี้ Total Plate Count ยังสามารถใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์นมว่ามีความสะอาดหรือมีแบคทีเรียปนเปื้อนหลังจากผ่านขบวนการแปรรูปหรือไม่ ก่อนนำไปจำหน่ายให้แก่ผู้บริโภค

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Standard Plate Count Agar
2. เครื่องนับ Colony ของแบคทีเรีย(Colony counter)
3. ขวดเก็บตัวอย่างน้ำนมที่ฆ่าเชื้อแล้ว
4. จานเลี้ยงเชื้อ(Strile petri dishes or plates)
5. หลอดแก้วขนาด 10 ml สำหรับทำการเจือจางตัวอย่าง(Dilution)
6. สารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่าง Physiological salt solution (NaCl 9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร) หรือใช้ 0.1% Peptone (Peptone 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร)
7. Sterile pipette ขนาด 1 และ 10 ml
8. ตู้อบเชื้อ(Incubator)
9. ตราชั่งที่ปรับค่าได้ตามตราชั่งมาตรฐาน(Calibrated) แล้ว
10. Vortex mixer
11. ตู้เย็น 0-5 ^{0}C
12. ตู้แช่แข็ง(Freezer) –15 ถึง –20 ^{0}C
13. เทอร์โมมิเตอร์ที่ได้มาตรฐาน
14. ตะเกียง
15. สำลีและแอลกอฮอล์
16. ปากกาสีกันน้ำ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Plate Count Agar มีวิธีเตรียมดังนี้

1. ชั่งสารตามสลากที่ระบุ (อาจลดอัตราส่วนตามที่ต้องการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ และ Flask

เครื่องชั่ง

ชั่งสาร

2. ผสมกับน้ำแล้วนำไปต้มให้ละลาย

เติม standard plate count agar และน้ำลงใน Flask

ผสมให้เข้ากันและต้มจนเดือด ระวังสารละลายล้นขณะเดือด

3. แบ่งใส่ขวดเพื่อความสะดวกในการใช้ และนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 ^{0}C นาน 15 นาที

แบ่งใส่ Flask หรือขวดแก้วแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. ทิ้งไว้ให้เย็นจนแข็งเป็นวุ้น แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C (สามารถเก็บได้นาน 1 เดือน)

5. เมื่อจะนำมาใช้ นำไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียว แล้วแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 45 ^{0}C ระวังอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อร้อนจนเกินไป อาจทำให้เชื้อตายได้ ให้คงอุณหภูมิที่ 45 ^{0}C

การเตรียมสารละลายเพื่อเจือจางตัวอย่าง

- Physiological salt solution

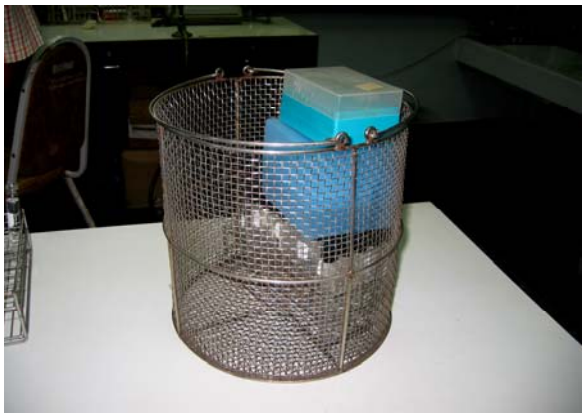
  ชั่ง NaCl 9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร หรือใช้

- 0.1% Peptone

  ชั่ง Peptone 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร

  จากนั้นดูดใส่หลอดแก้ว หลอดละ 9 ml ปิดฝาหลอดแก้ว (ระวังอย่าปิดแน่นจนเกินไป) จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกันกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งสารละลาย 0.1% peptone



นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

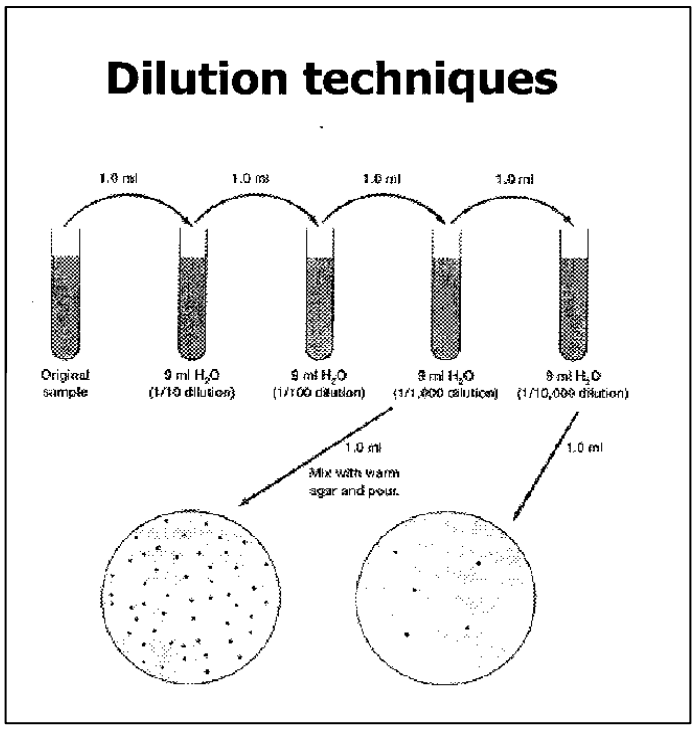
วิธีทดสอบ

ก่อนทำการทดสอบต้องเตรียมพื้นที่ในการทดสอบนี้ให้สะอาด และทุกขั้นตอนต้องปลอดเชื้อ (Aseptic technque)

การเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่างที่จะนำมาทดสอบ ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 ^{0}C เก็บไม่เกิน 12 ชั่วโมง และจดบันทึกอุณหภูมิของตัวอย่าง
2. เตรียมอุปกรณ์ให้พร้อม เขียนชื่อตัวอย่าง วันที่ทดสอบ และ Dilution ให้ชัดเจน ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญมาก
3. เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันดี ดูดตัวอย่างน้ำนมมา 1 ml ใส่จานเลี้ยงเชื้อและเทอาหาร (12-15 ml) ตามทันที (ได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1X10^0) เขย่าให้เข้ากัน ระวังอย่าให้ล้นขอบจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูดตัวอย่างนมอีก 1 ml ใส่ในหลอดที่มีสารละลายสำหรับเจือจาง เขย่ากับ Vortex ให้เข้ากันดี (ได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1:10^{-1}) ดูดสารละลายนี้1 ml ใส่ลงจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหารตามทันที ทำการเจือจางสาร(Dilution) และดูดใส่จานเลี้ยงเชื้อตามด้วยเทอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ตาม Dilution ที่ต้องการ หรือตามความเหมาะสมของตัวอย่างในแต่พื้นที่ ซึ่งตัวอย่างน้ำนมดิบมักนิยมใช้ Dilution 1X10^{-2}, 1X10^{-3}และ 1X10^{-4}

หมายเหตุ : อาจทำการเจือจางให้ได้ตาม Dilution ที่ต้องการก่อนแล้วจึงดูดสารละลายตัวอย่างใส่จานเลี้ยงเชื้อ



ต้องลนปากหลอดแก้วทุกขั้นตอนเพื่อป้องกันการปนเชื้อโรค (Aseptic Technic)

ผสมให้เข้ากันดี

ดูดสารละลาย Dilution ที่ต้องการลงจานเลี้ยงเชื้อ

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ

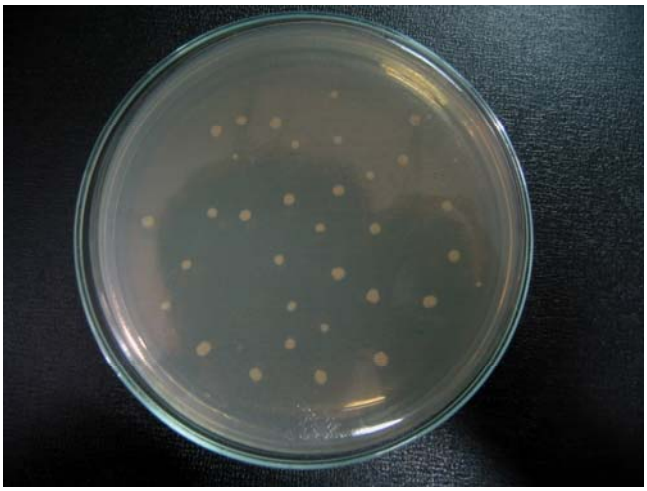
เขย่าให้เข้ากันระวังอย่าให้ล้น

4. ทิ้งอาหารให้แข็งเป็นวุ้น คว่ำจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ตู้อบเชื้ออุณหภูมิ 37 ^{0}C 48±3 ชั่วโมง หากมีตัวอย่างมากอย่าวางจานเลี้ยงเชื้อซ้อนกันจำนวนมากเพราะอุณหภูมิจะไปไม่ทั่วถึง ควรวางสับห่างกัน หรือวางให้อุณหภูมิไปทั่วถึงกันทุกจานเลี้ยงเชื้อ

บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 48 ชั่งโมง

การอ่านผล

1. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด โดยใช้ Colony counter หรือแว่นขยายช่วย และห้องที่มีแสงสว่างเพียงพอ ควรนับจานเลี้ยงเชื้อทันทีที่ครบชั่วโมงการบ่ม หากไม่สามารถนับได้ทันที เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ^{0}C ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง
2. จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อควรอยู่ระหว่าง 25-250โคโลนี
3. จดจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ อาจเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มของโคโลนีที่จับกลุ่มกันแน่นจะนับเป็น CFU(colony-forming unit) ต่อ ml



นับทุกโคโลนีที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

คำนวณจำนวนแบคทีเรียที่นับได้แต่ละเพลทได้ดังนี้

จำนวนแบคทีเรียที่นับได้/ค่า dilution

เช่น ถ้านับได้ 271 ที่ Dilution $1X10^{-3}$ จะมีจำนวนแบคทีเรีย 271/0.001= 271,000 จะรายงานเป็น 270,000 CFU/ ml การรายงานผลอธิบายไว้ในหัวข้อการคำนวณหน้าถัดไป

การคำนวณเมื่อเลือกตัวอย่าง 2 Dilution มาคำนวณ

1. เลือกเพลทที่นับแบคทีเรียได้ระหว่าง 25 - 250 โคโลนี และไม่มีการเกาะกลุ่มของแบคทีเรียเป็นสายจนไม่สามารถแยกโคโลนีได้(Spreader – free plate(s))
2. หากทุกเพลทมากกว่า 250 โคโลนี ให้รายงานว่า TNTC (Too Numerous Too Count) แต่ถ้าโคโลนีอยู่กระจายและสามารถนับได้ให้นับ และรายงานให้ระบุว่า ESPC(Estimated standard plate count)
3. **SPREADER แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ**
    1. โคโลนีที่เป็นสาย(chain) ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ เนื่องจากแบคทีเรียแตกแขนงมาจากกลุ่มแบคทีเรียเดิม
    2. เกิดจากเป็นแผ่นฟิล์มของน้ำระหว่างชั้นของอาหาร(Agar) กับก้นเพลท
    3. เกิดจากเป็นแผ่นฟิล์มของน้ำที่ขอบหรือผิวหน้าของอาหาร

หากพบว่าเพลทที่มี Spreader > 25 % ให้รายงานว่า spreader(spr) แต่ถ้าจำเป็นต้องนับเพลทที่มี Spreader มีหลักในการนับแบคทีเรียดังนี้

- หาก Spreader เป็นสาย(chain) ให้นับแต่ละสายเป็น 1 โคโลนี อย่านับโคโลนีของแบคทีเรียในสายแยกกัน
- Spreader แบบ 2 และ 3 โคโลนีจะแยกกัน ให้นับแต่ละโคโลนี
- นับ Spreader รวมกับโคโลนีอื่น ๆ เพื่อนำไปคำนวณต่อไป

4. ตัวอย่างที่ไม่พบโคโลนี ให้รายงานว่า พบแบคทีเรียน้อยกว่า 25 ของ Dilution ที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการทดสอบนั้น
5. หากพบว่าเกิดข้อผิดพลาดจากห้องปฏิบัติการให้รายงานว่า LA(Laboratory Accident)

การคำนวณ

ผลที่ได้จากการคำนวณให้รายงานเป็นเลขนัยสำคัญ 2 หลักแรกนับจากซ้าย

1. ถ้าเลขหลักที่ 3 จากซ้ายเป็นเลข 6,7,8 และ 9 ให้ปัดเลขหลักที่ 2 ขึ้น
2. ถ้าเลขหลักที่ 3 จากซ้ายเป็นเลข 1,2,3 และ 4 ให้ปัดเลขหลักที่ 2 คงเดิม
3. ถ้าเลขหลักที่ 3 จากซ้ายเป็นเลข 5 ถ้าเลขหลักที่ 2 เป็นเลขคี่ให้ปัดขึ้น แต่ถ้าเลขหลักที่ 2 เป็นเลขคู่ให้คงเดิม

ตัวอย่าง

Calculated count	SPC
12,700	13,000
12,400	12,000
15,500	16,000
14,500	14,000

1. เพลทที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 CFU

สูตรคำนวณ :

$$N = \Sigma C / [(1* n_1) +(0.1* n_2)]*(d)$$

N = จำนวนโคโลนี CFU / ml

ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมด

n_1 = จำนวนเพลทของ Dilution แรกที่นับ

n_2 = จำนวนเพลทของ Dilution ที่ 2 ที่นับ

d = Dilution แรกที่ใช้

ตัวอย่าง

1:100	1:1,000
232,244	33,28

N = (232+244+33+28) / [(1* 2) +(0.1* 2)]*(10^{-2})

= 537/0.022

= 24,409

= 24,000

2. กรณีที่ < 25 CFU ให้รายงานว่า พบแบคทีเรียน้อยกว่า 25 X 1/d เมื่อ d = dilution แรกที่ใช้

ตัวอย่าง

Colonies		
1:100	**1:1,000**	**ESPC/ml**
18	**2**	**< 2,500**
0	**0**	**< 2,500**

3. กรณีทุกเพลท >250 CFU แต่ยังน้อยกว่า 100 /cm^2 ให้ใช้เพลทที่ใกล้เคียง 250 มากที่สุดแล้วรายงานเป็น ESPC

ตัวอย่าง

Colonies		
1:100	**1:1,000**	**ESPC/ml**
TNTC	**640**	**640,000**

4. ถ้าเพลทนั้นมี Spreader และ Laboratory Accident ให้รายงาน SPR และ LA ตามลำดับ

5. กรณีทุกเพลท >250 CFU และมากกว่า 100 /cm^2 ให้รายงานเป็น ESPC ที่มากกว่า 100 เท่าของ Dilution ที่มากที่สุด คูณด้วยพื้นที่เพลท(cm^2)

ตัวอย่าง

Colonies		
1:100	**1:1,000**	**ESPC/ml**
TNTC	**7,510[(a)]**	**> 6,500,000**
TNTC	**6,490[(b)]**	**> 5,900,000**

a = พื้นที่เพลท = 65 cm^2

b = พื้นที่เพลท = 59 cm^2

การเพาะหาเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม

การเพาะหาเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมเป็นการตรวจหาชนิดของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาเต้านมอักเสบในแม่โคนมในกรณีที่เป็นตัวอย่างน้ำนมดิบรายตัว หรือแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลงไปในถังน้ำนมรวมในกรณีเก็บตัวอย่างน้ำนมดิบรายฟาร์มมาวิเคราะห์เพื่อจะได้ทราบปัญหาเต้านมอักเสบ หรือการจัดการในขบวนการรีดนมและแก้ไขปัญหาได้ถูกต้อง

จุดประสงค์

1. เพื่อทราบชนิดของเชื้อที่สามารถพบได้ในน้ำนม ทั้งที่ก่อโรครุนแรง ก่อโรคไม่รุนแรง และเกิดจากการปนเปื้อน
2. เพื่อได้ทราบถึงลักษณะภายนอกและสีของโคโลนีของเชื้อ
3. เพื่อทราบถึงลักษณะการติดสี รูปร่าง และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด
4. เพื่อทดสอบความไวยา

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Sterile petridish
2. Loop
3. หัวแก๊สและถังแก๊ส
4. Blood agar
5. MacConkey agar
6. Incubator อุณหภูมิ 37 ^{0}C
7. สไลด์ แก้ว(Glass slide) ที่สะอาด
8. น้ำกลั่น
9. สีย้อม Gram stain
10. นาฬิกาจับเวลา
11. แอลกอฮอล์ 70 %
12. กล้องจุลทรรศน์
13. ปากกา Permanent
14. กระดาษชำระ
15. กระบอกฉีดน้ำ
16. น้ำมันสำหรับดูกล้อง X100 (Oil immersion objective lens)
17. น้ำยาเช็ดเลนส์(Xyline)
18. ไม้ขีดไฟ
19. ตู้อบเชื้อ(Autoclave)

20. Hot air oven
21. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
22. เครื่องกวนสารเคมี
23. เครื่องปั่นสารเคมี(Vortex mixer)
24. เครื่องวัด pH
25. ตู้เย็น
26. หลอดทดลอง
27. Flask
28. กระบอกตวงสาร(Clylinder)
29. กระดาษสีน้ำตาลสำหรับอบ จานเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอุปกรณ์

1. นำจานเลี้ยงเชื้อที่ล้างสะอาดและเช็ดให้แห้งแล้ว นำมาห่อด้วยกระดาษสีน้ำตาล 1 ห่อสามารถใส่จานเลี้ยงเชื้อได้ 10 -12 เพลท

ห่อจานเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

2. เมื่อห่อเสร็จแล้วใช้กระดาษกาวติดแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อใน Hot air oven ใช้เวลาอบประมาณ 1 1/2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 150 ^{0}C ในห่อจะติด Autoclave tape หากเกิดการปลอดเชื้อ(Sterile) อย่างสมบูรณ์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม

นำจานเลี้ยงเชื้อไปอบฆ่าเชื้อใน Hot air oven

3. นำหลอดทดลอง Flask บีกเกอร์ และวัสดุต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออบฆ่าเชื้อทุกชนิดก่อนนำไปใช้

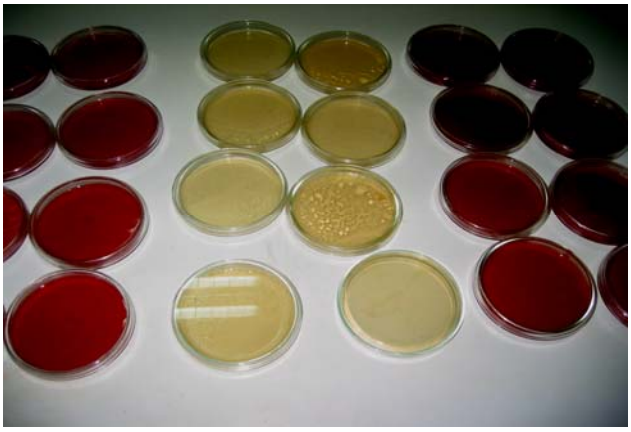
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. นำ Blood agar McConkey agar และ Muller hinton agar ที่เป็นผงนำมาชั่งตามฉลากแนะนำ โดยใช้เครื่องชั่งอย่างละเอียด และนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใส่ Flask ที่เตรียมไว้ ใส่น้ำกลั่นตามที่คำนวณไว้แล้วนำมาต้มที่เตา (เครื่องกวนสารเคมี) ต้มจนเดือดแล้วปิด Flask ด้วยกระดาษฟอยล์ ปิดทับด้วยกระดาษกาวอีกชั้นกันกระดาษฟอยล์หลุด (อาจใช้ Flask ที่มีฝา) แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 ^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้อุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 ^{0}C แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ประมาณ 10-12 ml แล้วปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ แข็งตัว



ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อให้แข็งตัว

3. เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แข็งตัวแล้ว ให้นำมาเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-5 ^{0}C สามารถเก็บไว้ได้นาน 1-2 สัปดาห์

เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้เย็น

4. เมื่อมีตัวอย่างที่จะนำมาเพาะเชื้อให้นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็น มาเข้าตู้ Incubator ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C จนน้ำที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วจึงนำมาเพาะเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการเพาะเชื้อแบคทีเรีย

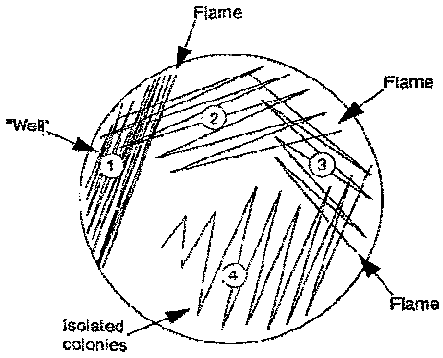
1. เมื่อรับตัวอย่างน้ำนมมาแล้ว ให้เผา Loop เพื่อฆ่าเชื้อทีละอัน โดยสังเกตจากลวด loop เปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อเผาด้วยหัวก๊าซ ควรให้ loop โดนเปลวไฟสีฟ้า เพราะจะมีความร้อนสูงกว่าเปลวไฟสีแดง เมื่อ loop เป็นสีแดงแล้ว แสดงว่าลวดบริเวณนั้นถูกฆ่าเชื้อแล้ว แต่ถ้าหากลวด loop ไปถูกหรือแตะสิ่งอื่น ๆ ก่อนการใช้งานต้องนำกลับไปเผาไฟซ้ำอีกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อใหม่

เผา loop

2. เขย่าตัวอย่างน้ำนมให้เข้ากันดีก่อน โดยพลิกกลับไปมา 2-3 ครั้ง หรือใช้ Vortex mixer ก็ได้ แล้วใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อและเย็นแล้วแตะน้ำนมที่ได้รับมา 1 loop เต็ม แล้วนำมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้เขี่ยเชื้อตามรูป (ทั้งใน MacConkey และ Blood agar)

แตะน้ำนม 1 loop

เขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



แนวในการเขี่ยเชื้อ

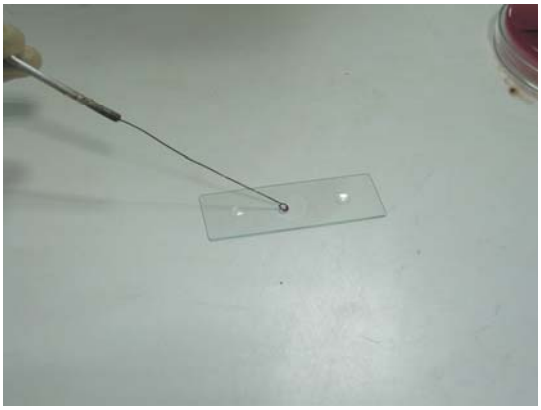
หลังจากเขี่ยเชื้อในแต่ละแนว (แนวที่ 1, 2 และ 3) ต้องเผา loop จนแดง และรอให้เย็นก่อนนำไปใช้เขี่ยครั้งใหม่(ในระหว่างการเขี่ยเชื้อไม่ควรพูดคุย เพราะจะทำให้เชื้อภายในช่องปากปนเปื้อนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และควรให้อาหารเลี้ยงเชื้อสัมผัสกับอากาศภายนอกเพลทน้อยที่สุด เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อในอากาศทั่วไป

3. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นาน 24-48 ชั่วโมง

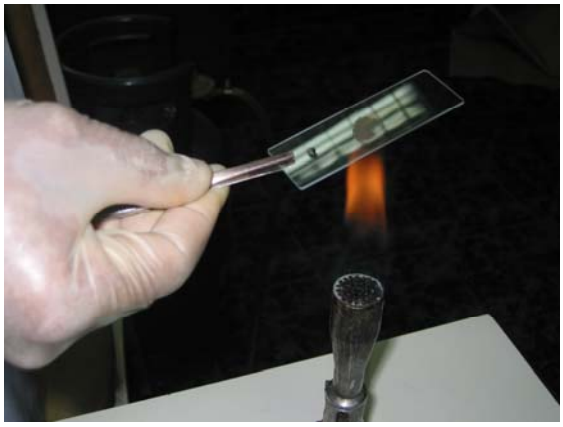
4. อ่านผล (ลักษณะรูปร่างภายนอกของโคโลนี สี ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขึ้น)
5. ทำการย้อมสีของโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นดังนี้
    a. หยดน้ำกลั่น 1 หยด ลงบน slide ที่สะอาด จากนั้นใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อจากโคโลนีของเชื้อมาเล็กน้อย สเมียร์เชื้อผสมกับน้ำกลั่นให้แผ่กระจายเป็นวงกลมปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือช่วยโบกสไลด์ให้แห้ง(air dry) แล้วทำการ fix ด้วยเปลวไฟ ปล่อยให้ slide เย็นแล้วทำการย้อมด้วยสี Gram stain

สี Gram stain

ใช้ loop แตะ โคโลนีของเชื้อเล็กน้อย

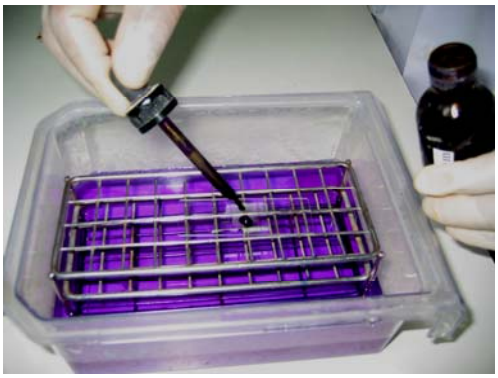


ผสมกับน้ำกลั่นแผ่ขยายให้เป็นวงทิ้งไว้ให้แห้ง

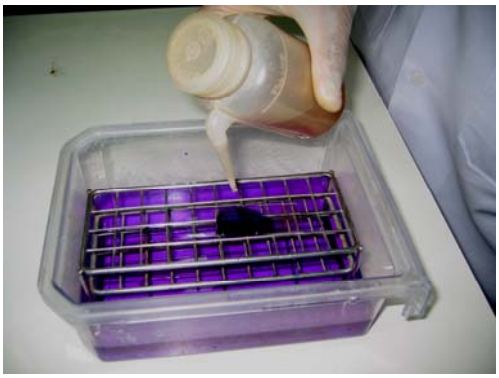


fix ด้วยเปลวไฟ

b. หยด Ammonium oxalate-crystal violet ให้ท่วมรอยของเชื้อที่เย็น ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

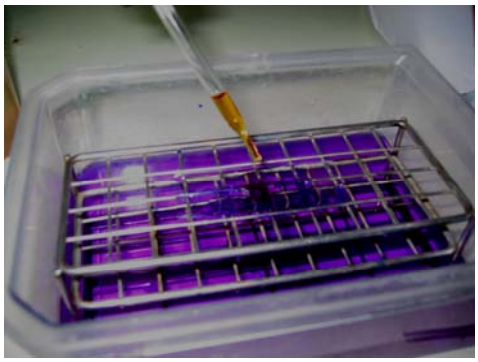


หยด Ammonium oxalate-crystal violet

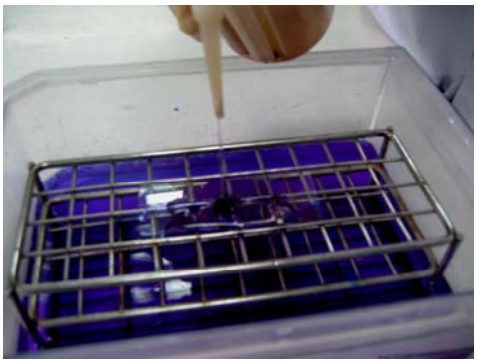


ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

c. หยดด้วย Lugol's iodine ให้ท่วมรอยของเชื้อที่ขึ้น ทิ้งไว้นาน 1 นาทีล้างออกด้วยน้ำเปล่า

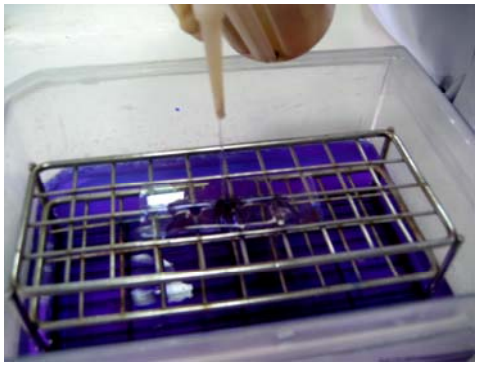


หยดด้วย Lugol's iodine

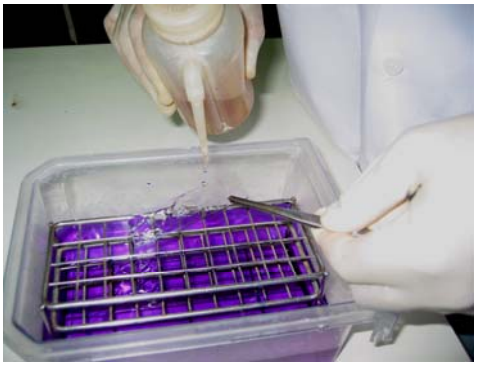


ล้างด้วยน้ำเปล่า

d. หยดด้วย 95% Alcohol บนรอยที่เขี่ยเชื้อ หยดเรื่อย ๆ จนสีจางใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 15-30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า

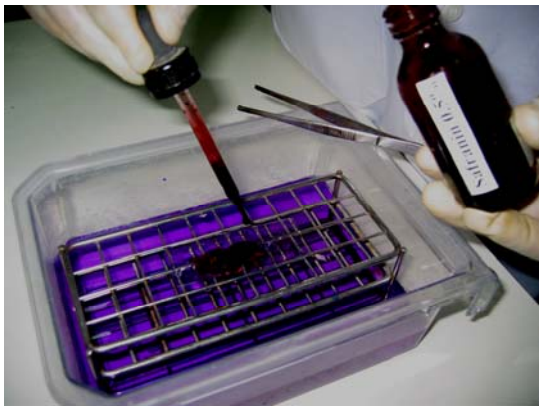


หยดด้วย 95% Alcohol

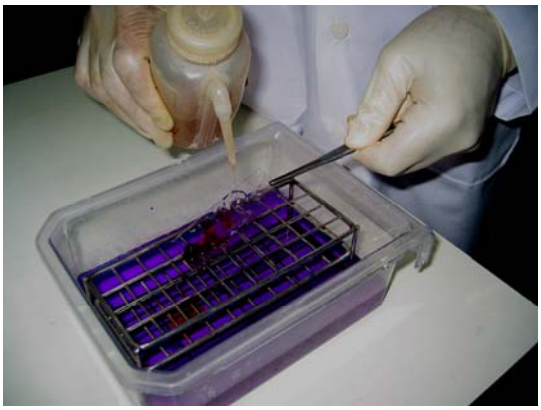


ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

e. หยดด้วย 0.5% Safranin ให้ท่วมรอยของเชื้อที่เขี่ย ทิ้งไว้นาน 15-30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำเปล่า



หยดด้วย 0.5% Safranin



ล้างออกด้วยน้ำเปล่า

f. ซับสไลด์ให้แห้งด้วยกระดาษซับ (สไลด์ด้านที่ไม่ใช้สเมียร์) วางสไลด์ทิ้งไว้สักครู่จนสไลด์ที่สเมียร์แห้งสนิท

ซับสไลด์ให้แห้งด้วยกระดาษซับ

g. แล้วตรวจดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

ตรวจดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

6. บันทึกผล (วาดรูปและบอกถึงลักษณะรูปร่าง) และการติดสีของแบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมบวกย้อมติดสีม่วงน้ำเงิน และแบคทีเรียแกรมลบย้อมติดสีแดง

7. จดบันทึกลักษณะของคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียบางชนิด โดยดูการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีต่าง ๆ

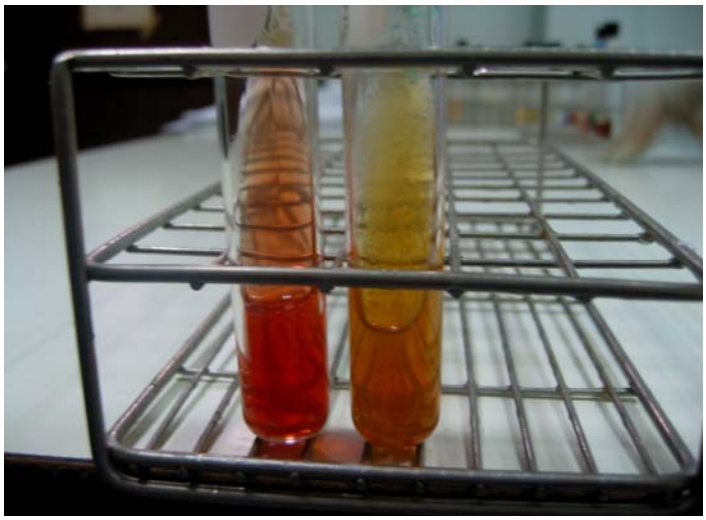
การทดสอบทางเคมี (Biochemical test)

1. นำเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เพาะขึ้นใน Blood Agar และ MacConkey Agar มาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ และเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยการแยกโคโลนีที่ขึ้นใน Blood Agar และหรือ MacConkey Agar ของเชื้อแต่ละชนิดที่แตกต่างกันนำมาเพราะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar และหรือ MacConkey Agar อีกครั้งจนเป็นเชื้อชนิดเดียวเท่านั้น

2. นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาทำการทดสอบทางเคมี(Biochemical test) และดูผลตามตารางว่าเชื้อตัวที่ทดสอบตรงกับทางผลการทดสอบทางเคมีในตารางใด ให้นำแบคทีเรียมาทดสอบทางเคมีตามตารางนั้น

3. อ่านผลว่าเป็นเชื้อชนิดใด

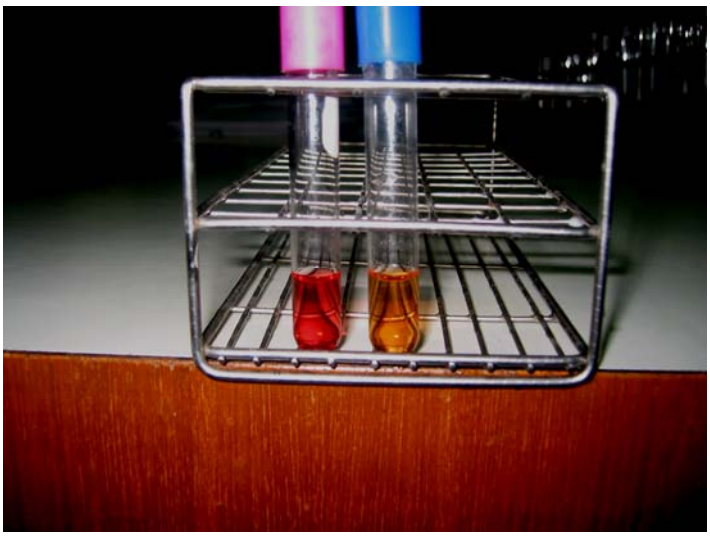
แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ



แสดงผลทางชีวเคมีจาก TSI (Triple sugar iron)

- ถ้าผลบวก(Positive) จะให้สีเหลืองส่วนใดส่วนหนึ่งของหลอด

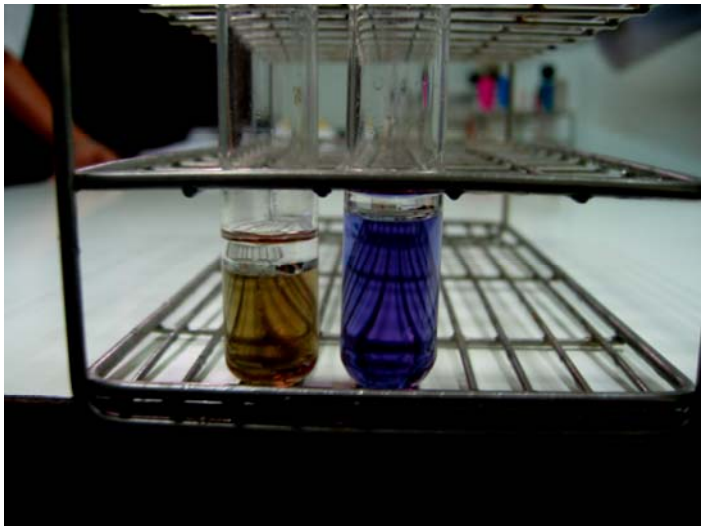
- ถ้าผลลบ(Nagative) จะเป็นสีเดิมคือ สีแดงทั้งหลอด



แสดงผลทางชีวเคมีจากการทดสอบน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

- ถ้าผลบวก(Positive) จะเป็นสีเหลืองทั้งหลอด

- ถ้าผลลบ(Negative) จะเป็นสีแดง



แสดงผลทางชีวเคมีของ lysine

- ถ้าผลบวก(Positive) จะเป็นสีม่วงเข้ม

- ถ้าผลลบ(Nagative) จะเป็นสีเดิม (น้ำตาลจาง ๆ)

แสดงผลทางชีวเคมีของ ornithine

- ถ้าผลบวก(Positive) จะเป็นสีม่วง

- ถ้าผลลบ(Nagative) จะเป็นสีเดิม (สีน้ำตาลจาง ๆ)

เมื่อเพาะตัวอย่างน้ำนมหาเชื้อแบคทีเรียบน Blood agar และ MacConkey agar ซึ่งดูผลการเพาะเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อที่เพาะบน MacConkey agar หากไม่พบเชื้อภายใน 72 ชั่วโมง อ่านผลว่าเป็นลบ(Negative culture) แต่สำหรับการเพาะเชื้อบน Blood agar เพาะนาน 7 วัน หากเชื้อไม่ขึ้นจึงจะถือว่าเป็นลบ

การแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไปพิจารณาจากการขึ้นของเชื้อบน Blood agar และ MacConkey agar (ดู figure 1 และ 2 ประกอบ) นำเชื้อแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเพาะบน TSI agar(Triple sugar iron agar) จะเกิดปฏิกิริยา 3 ลักษณะดังนี้

1. เมื่อเกิด H_2S อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (สีของ TSI agar เป็นสีม่วงอ่อน) อ่านผลเป็นบวก (Positive)
2. หากแบคทีเรียใช้หรือหมักน้ำตามกลูโคส(Glucose) ที่ก้นหลอดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
3. หากแบคทีเรียไม่มีการใช้น้ำตาล สีจะไม่เปลี่ยนแปลง อ่านผลเป็นลบ(Negative culture)

แบคทีเรียที่ขึ้นบน Blood agar แต่ไม่ขึ้นบน MacConkey agar ให้เพาะบน TSI agar และย้อมสีแยกชนิดแบคทีเรียว่าเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกจะให้ผลบวกต่อการทดสอบคาตาเลส(Catalase test) ซึ่งทดสอบโดยใช้ loop แตะบนโคโลนีของแบคทีเรีย จากนั้นแตะลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยด 3% hydrogen peroxide 1 ml เอนไซม์คาตาเลส(Catalase) ของแบคทีเรียจะเปลี่ยน Hydrogen peroxide ไปเป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน จะเห็นเป็นฟองเกิดขึ้น

ดูแผนภาพจาก Figure 1 และ 2 สรุปพอสังเขปได้ดังนี้

1. เพาะหาเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำนมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และ Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C

2. อ่านผลภายใน 24 ชั่วโมง หากเชื้อยังไม่ขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ให้บ่มต่อแล้วอ่านผลทุกวัน (หากเชื้อไม่ขึ้นบน MacConkey agar ภายใน 3 วัน อ่านผลเป็นลบ สำหรับ Blood agar หากเชื้อไม่ขึ้นภายใน 7 วัน ให้อ่านผลเป็นลบ) อ่านผลแบ่งเชื้อเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (รายละเอียดอธิบายไว้ในหัวข้อการแยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย)

(a) เชื้อแบคทีเรียขึ้นบน MacConkey agar และเชื้อขึ้นเร็ว

(b) เชื้อแบคทีเรียขึ้นบน MacConkey agar และเชื้อขึ้นช้า

(c) เชื้อแบคทีเรียขึ้นบน Blood agar เท่านั้น และเป็นเชื้อแกรมลบ

(d) เชื้อแบคทีเรียขึ้นบน Blood agar เท่านั้น และเป็นเชื้อแกรมบวก

(e) เชื้อแบคทีเรียขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารพิเศษ(Special growth requiment) และสภาวะอากาศ(Atmospheric) ที่จำเพาะ

3. นำเชื้อที่ขึ้นบน MacConkey agar และ/หรือ Blood agar เพาะบน TSI agar

4. แยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดย Catalase test

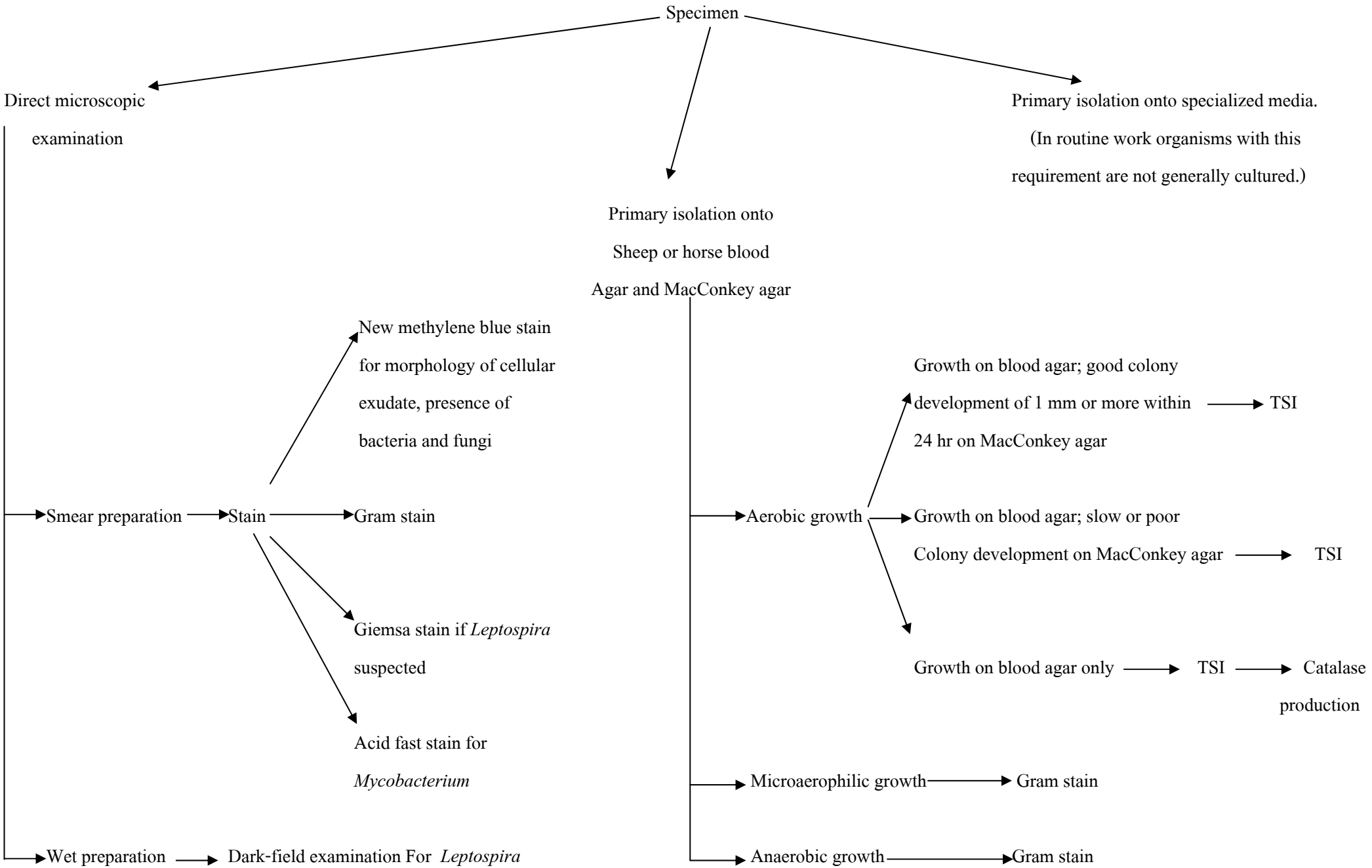


Figure1. Flow sheet for the laboratory isolation of the more frequently occurring pathogenic bacteria.

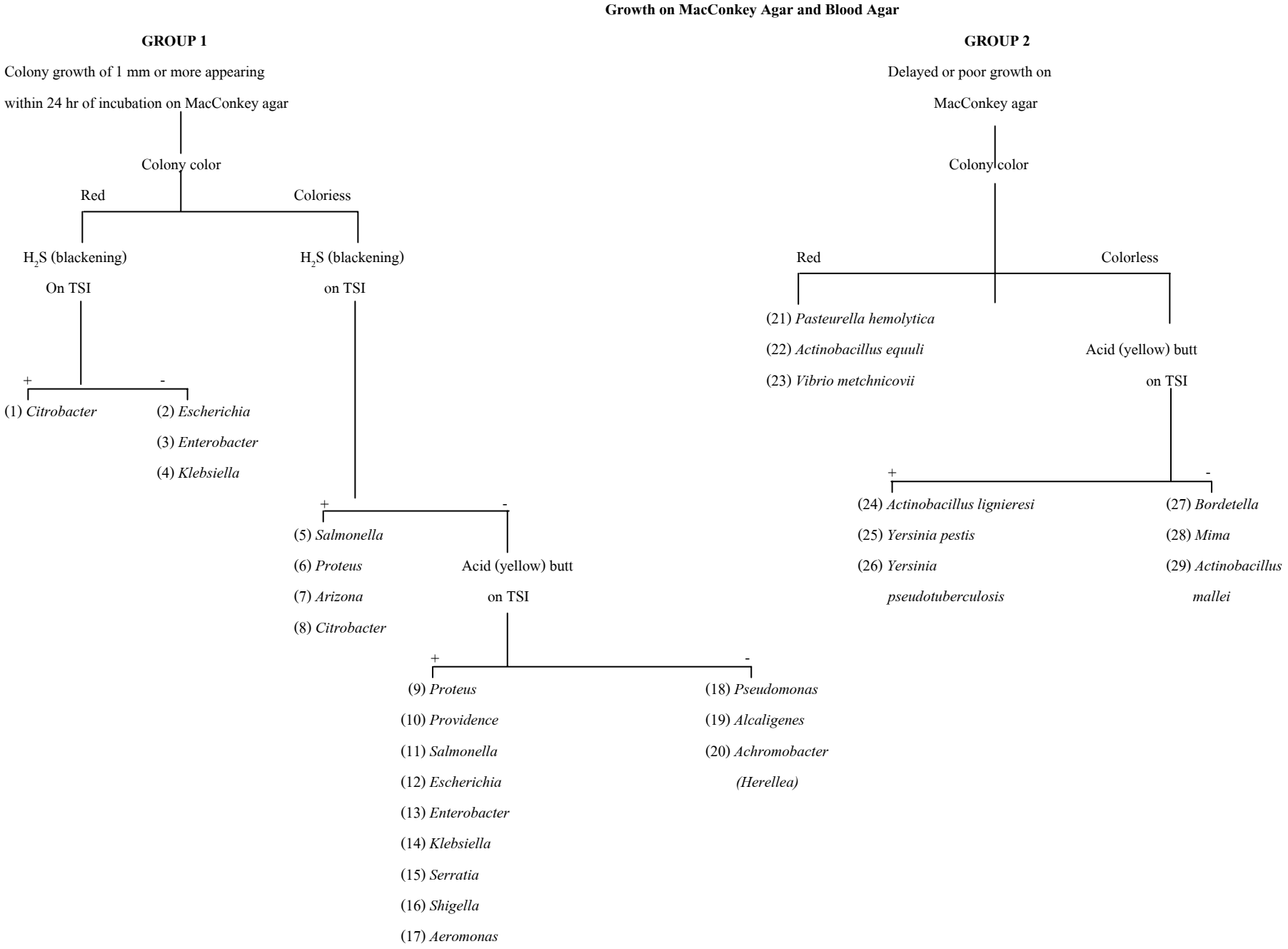


Figure 2. Outline of steps for presumptive identification of bacteria. The tests under consideration are indicated on the vertical lines, and results of the tests are on the horizontal lines directly below the tests.

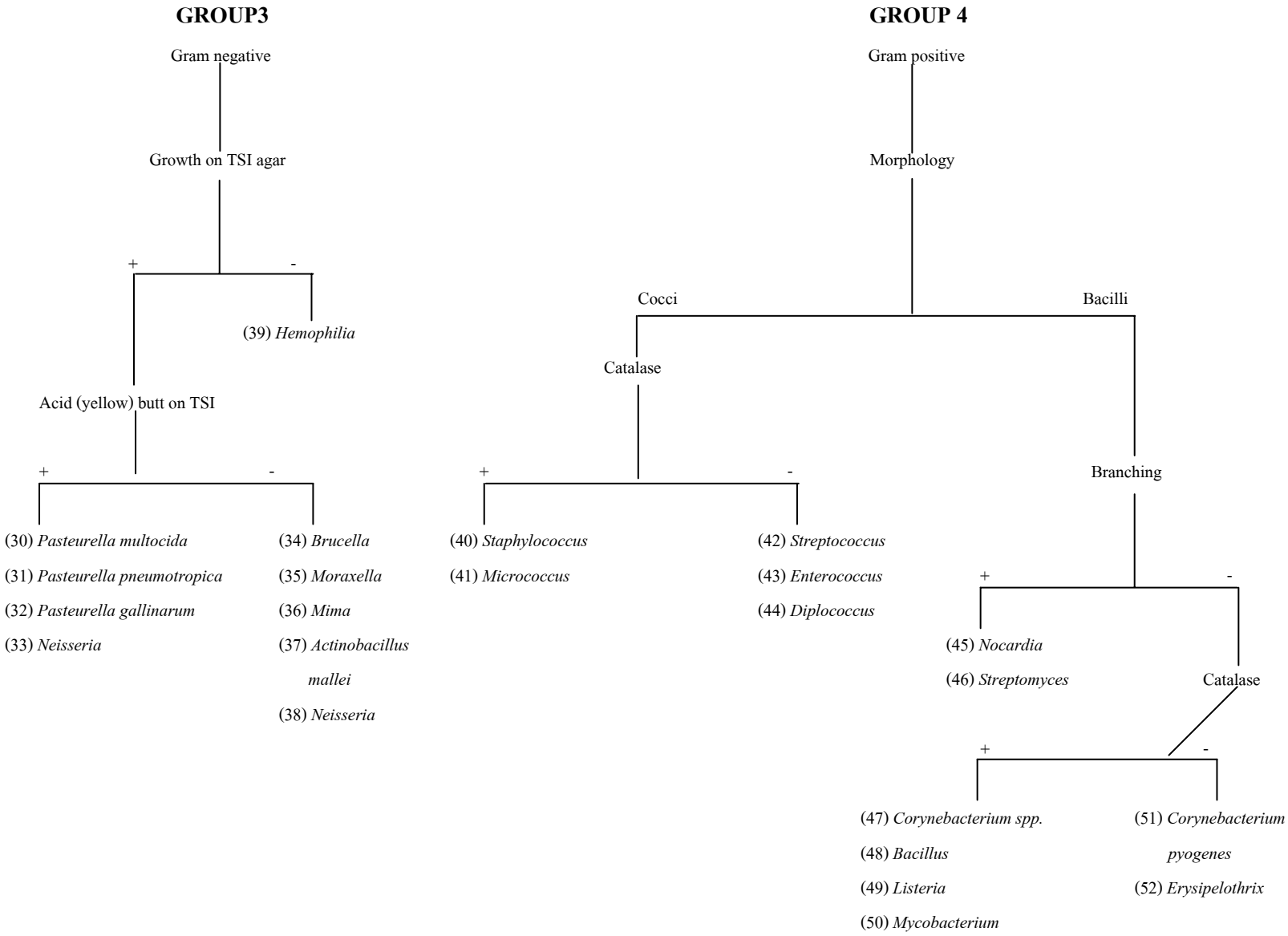


figure 2 (Continue)

Organisms with Special Growth Requirements

Group 5

Special nutritional requirements

(53) *hemophilus**

(54) *Leptospira*

(55) *Mycobacterium*

(56) *Pasteurella tularensis*

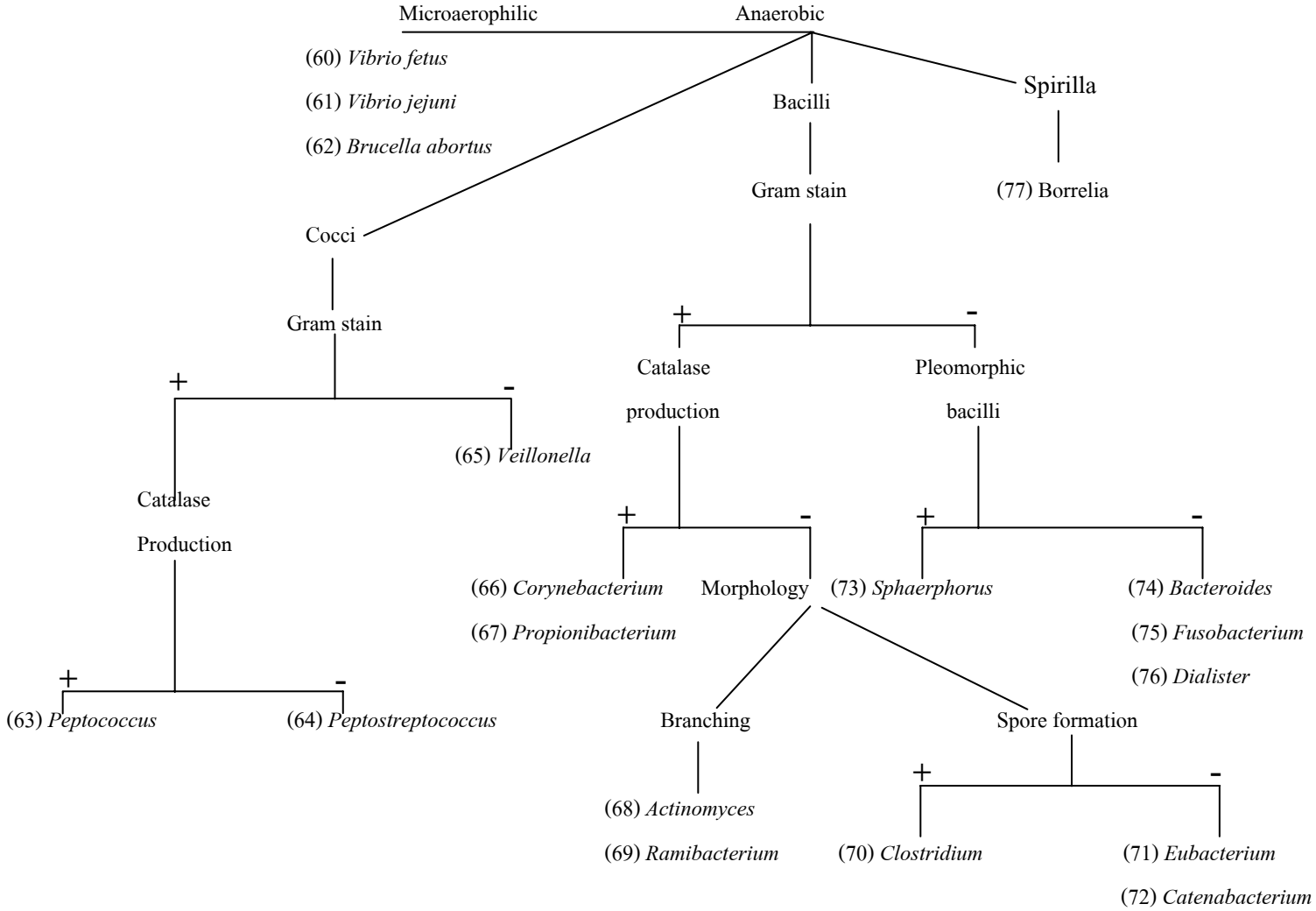
(57) *Mycoplasma*

(58) *Colesiota*

(59) *Coxiella*

Group 6

Atmospheric



**Hemophilus* will grow on sheep or horse blood agar.

Figure 2 (Continued)

การแยกกลุ่มแบคทีเรีย(Genera of bacteria)

Group I เชื้อที่ขึ้นเร็วบน MacConkey Agar(Rapid colony development on MacConkey agar)

Group I (a) เกิดการหมักของน้ำตาลแลคโตส(Rapid lactose fermentation) โคโลนีที่ขึ้นมีสีแดง(Red colonies) (Table 1)

Group I (b) ไม่เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตสหรือเกิดได้ช้า(No or delayed lactose fermentation) โคโลนีไม่มีสี(Colorless colonies) และสร้าง H_2S(Production of H_2S) (Table 2)

Group I (c) ไม่เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตส(No lactose fermentation) โคโลนีไม่มีสี(colorless colonies) หมักน้ำตาลกลูโคส (ให้สีเหลืองที่ก้นหลอด TSI)(Glucose fermentation(yellow butt on TSI)) (Table 3)

Group I (d) เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตสหรือไม่เกิดการหมัก(Delayed or no lactose fermentation) โคโลนีไม่มีสี(Colorless colonies) ไม่เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส (ไม่เกิดการเปลี่ยนสีที่ก้นหลอด TSI) (no glucose fermentation (no change in butt on TSI agar)) (Table 4)

Group II เชื้อที่ขึ้นช้าบน MacConkey(Slow or poor Colony Development on MacConkey Agar)

Group II (a) เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตส(Rapid lactose fermentation) โคโลนีมีสีแดง(Red Colonies) (Table5)

Group II (b) เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตสได้ช้าหรือไม่เกิด(Delayed or no lactose fermentation) โคโลนีไม่มีสี(Colorless colonies) เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสบน TSI agar(Glucose fermentation(yellow button TSI agar)) (Table 6)

Group II (c) เกิดการหมักน้ำตาลแลคโตสได้ช้าหรือไม่เกิด(Delayed or no lactose fermentation) โคโลนีไม่มีสี(Colorless colonies) ไม่เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสบน TSI agar(no glucose fermentation (no change in butt on TSI agar)) (Table 7)

Group III เชื้อขึ้นบน Blood Agar แต่ไม่ขึ้นบน MacConkey agar แบคทีเรียแกรมลบ(Growth on Blood Agar but no Growth on MacConkey Agar; Organisms Gram Negative)

Group III (a) เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส ให้สีเหลืองที่ก้นหลอด TSI(Glucose fermentation (yellow butt on TSI)) (Table 8)

Group III (b) ไม่เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส(No glucose fermentation (no change in butt on TSI agar)) (Table 9)

Group III (c) เชื้อไม่ขึ้นบน TSI(No growth on TSI)

Group IV เชื้อขึ้นบน Blood Agar แต่ไม่ขึ้นบน MacConkey Agar แบคทีเรียแกรมบวก(Growth on Blood Agar but no Growth on MacConkey Agar; Organisms Gram Positive)

Group IV (a) แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม สร้างเอนไซม์ Catalase(Gram-positive, catalase-producing cocci) (Table 10)

Group IV (b) แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ไม่สร้าง Catalase(Gram-positive cocci; no catalase production) (Table 11 และ Table 12)

Group IV (c) แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเป็นแท่ง(Gram-positive bacilli) (Table 13, 14 และ 15)

Group V แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่จำเพาะ(Organisms with Special Nutritional Requirements)

Group VI (a) Microaerophilic environment

Group VI (b) Anaerobic enviroment

หมายเหตุ - Group V, Group VI (a) และ VI (b) ใช้ Table 16-19

- เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารและบรรยากาศที่จำเพาะ และมิได้เพาะเป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการ จะเพาะเชื้อกลุ่มดังกล่าวนี้เมื่อผู้ส่งตัวอย่าง หรือผู้ที่ทำการเพาะเชื้อสงสัยว่าจะเป็นเชื้อกลุ่มนี้

TABLE 1

	Gram Stain	Citrate utilization	H^2S production (blackening on TSI)	Indole production	motility	Urease production	Lysine decarboxylase production
*Arizona**	-		+	-	+	-	+
Citrobacter	-	+	+	v	+	v	-
Escherichia	-	-	-	+	+	-	v
Enterobacter[+]	-	+	-	-	+	v	v
Klebsiella	-	+	-	-	-	+	+

* Very occasionally *Arizona* ferments lactose.

[+] Enterobacter never produces both urease and lysine decarboxylase.

TABLE 2

	Gram stain	Urease production	Lysine decarboxylase production	Malonate utilization	Agglutination, Salmonella antiserum
Salmonella	-	-	+	-	+
Froteus	-	+	-	-	-
Arizona	-	-	+	+	- (or w+)
Citrobacter	-	- (or w+)*	-	- (or w+)	-

*w+ = weak positive occasionally.

TABLE 3

	Gram stain	Urease production	Indole production	Citrate utilization	Voges-Proskauer reaction	Motility	Arabinose fermentation	Lysine decarboxylase	Agglutination, Salmonella	Oxidase production
Proteus	-	+	v	v	-	+	-	-	-	-
Providence	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Salmonella	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Escherichia	-	-	+	-	-	+	+	v	-	-
Enterobacter	-	- (or w+)	-	+	+	+	+	v	-	-
Klebsiella	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Serratia	-	w+	-	+	+	+	-	+	-	-
Shigella	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-
Aeromonas	-	-	-	v	v	v	v	v	-	+

TABLE 4

	Gram stain	Oxidase production	OF glucose reaction	Motility	Nitrate reduction
P. aeruginosa	-	+	O	+	+
P. pseudomallei	-	+	F	+	+
Achromobacter	-	-	O	-	-
Alcaligenes	-	+	-	+	+ (-)

TABLE 5

	Gram stain	Urease production	Motility
P. hemolytica	-	-	-
A. Equuli	-	+	-
V. metschnikovii	-	-	+

TABLE 6

	Gram stain	Oxidase production	Urease production	Motility	Hemolysis on blood agar
A. lignieresi	-	+	+	-	v
Y. pestis	-	-	-	-	-
Y. peudotuberculosis	-	-	+	+	-
*Pasteurella hemolytica**	-	+	-	-	+
Vibrio comma[+]	-	+	-	+	-

*Late lactose fermentation may result in colorless colonies on MacConkey agar.

[+]Usually requires CO2 For initial isolation.

TABLE 7

	Gram stain	Oxdase production	Urease production	Motility	Diplococcoid morphology	Indole production	Nitrate reduction
Bordetalla	-	+	+	+	-	-	+
Mima	-	- *	-	-	+	-	-
A. mellei	-	-	-	-	-	-	+
Rare isolates							
Vibrio fetus	-	+	-	+	-	-	+
Brucella abortus[+]							
Type I	-	+	+	-	-	-	+
Moraxella sp.							
Type II	-	+	+	-	+	-	+ (-)
Flavobacterium	-	+	-	-	-	+	-

*Occasionally positive; know as Mima polymorpha var. oxidans.

[+]Usually requires CO2 for initial isolation; *Brucella abortus* (Type I) is also penicillin resistant.

TABLE 8

	Gram stain	Urease production	Indole production	Nitrate reduction	Diplococcoid morphology	Oxidase production
*P. multocida**	-	-	+	+	-	+
P. pneumotropica[+]	-	+	+	+	-	+
P. gallinarum	-	-	-	-	-	+
Neisseria	-	-	-	-	+	+

*Key reactions of *Pasteurella multocida* are those involving indole nitrate.

[+]May need a drop of serum on slant to give positive urease production.

TABLE 9

	Gram stain	Morphology	Oxidase production	Urease production	Beta hemolysis	Motility
Brucella	-	bacillus	+	+	-	-
Moraxella	-	diplococcoid	+	-	+	-
Mima	-	diplococcoid	- (rarely +)	- (rarely +)	-	-
A. mellei	-	bacillus	-	-	-	-
P. pseudomallei	-	bacillus	+		-	+
Neisseria	-	diplococcus	+	-	-	-

TABLE 10

	Gram stain	Coagulase production*	Acid butt on TSI agar
S. auresu	+	+	+
S. epidermidis	+	-	+
Micrococcus	+	-	-

TABLE 11

	Bacitracin sensitivity	Growth in Streptococcus faecalis SF broth	Growth in 6.5% NaCl	Optochin sensitivity
*Streptococcus**	-	-	-	-
S. pyogenes, group A	+	-	-	-
"Enterococci", group	-	+	+	-
Diplococcus	-	-	-	+

TABLE 12

	Lancefield group	Hemolysis	Bacitracin sensitivity	Ccmp test	Inulin fermentation	Lactose fermantation	Sorbitol fermentation	Salicin' fermentation	Growth in SF borth	Optochin sensitivity
S. pyogenes	A	Beta	+	-	-	+	-	+	-	-
S. agalactiae	B	v	-	+	-	+	-	+	-	-
S. uberis	C	v	-	+	+	+	+	+	-	-
S. dysgalactiae	C	v	-	-	-	+	v	-	-	-
S. equi	C	v	-	-	-	-	-	+	-	-
S. zooepidemicus	C	beta	-	-	-	+	+	+	-	-
S. equisimilis	C	beta	-	-	-	v	-	+	-	-
S. canis	C	beta	-	-	-	+	-	+	-	-
"Enterococci"	D	v	-	-	-	+	v	+	+	-
D. pneumoniae		alpha	-	-	+	+		v	-	+

* On horse blood agar.

TABLE 13

Branching organisms	"Sulfur granules" in pathological material	Production of aerial mycelium and conidia	Casein hydrolysis[+]	Production of tyrosinase
*Nocardia sp.**	+	-	-	-
Streptomyces sp.	-	+	+	+

*May be weakly acid-fast.

[+]Within three days.

TABLE 14

Gram-positive bacilli	Beta hemolysis	Acid-fast	H2S on TSI agar	Motility	Spore formation
Corynebacterium spp.	- (+)	-	-	-	-
Bacillus sp.	+ (-)	-	-	+	+
B. anthracis	-	-	-	-	+
Listeria	+	-	-	+[+]	-
Mycobacterium	-	+	-	-	-
C. pyogenes	+	-	-	-	-
Erysipelothrix	- (+)	-	+ *	-	-

*May take from three to five days for blackening to become evident.

[+]Best demonstrated at room temperature.

TABLE 15

Corynebacterium	Hemolysis	Catalase production	Acid butt in TSI glucose fermentation	Lactose fermentation	Sucrose fermentation
C. pyogenes	+	-	+	+	+
C. equi	-	+	-	-	-
C. renale	- (+)	+	+	-	-
C. pseudotuberculosis	- (+)	+	+	+	+

TABLE 16

	Growth in Thioglycolate broth	Morphology	Nitrate reduction	Mannitol fermentation
A. bovis	diffuse	branching rare, few filaments	-	-
A. baudeti	granular, clear broth	branching, filamentous	+	+

TABLE 17

Some Typical Reactions of Clostridia

Test	C. movyi	C. perfringens	C. septicum	C. hemolyticum	C. chauvoei	C. tetani	C. botulinum	C. bifermentans	C. terium	C. sporogenes	C. histolyticum
Motillity	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose fermentation	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Lactose fermentation	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Sucrose fermentation	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Salicin fermentation	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Indole production	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Nitrate reduction	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Sulfide (H^2S)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
production	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Proteolysis	ovoi	ovoi	ovoi	ovoi	ovoi	round	ovoi	ovoi	ovoi	ovoi	ovoid
Spore morphology*	d E	d C	d E	d ST	d E	T	d E	d E	d T	d E	ST

*C = central, E = eccentric, ST = Subterminal, T = terminal.

TABLE 18

	Morphology	Black colonies	Gas in culture media	Fetid odor
C. contortum	chains	-	+	-
C. lottii	chains	-	-	-
C. nigrum	chains	+	-	+
E. disciformans	small masses	-	-	-
E. obstii	single rods	-	+	+

TABLE 19

	Morphology	Beta hemolysis	Indole production	Fetid odor	Black colonies
S. necrophorus	pleomorphic rods	+	+	+	-
S. nodosus	pleomorphic rods	-	+	+	-
B. fragilis	blunt rods	-	-	+	-
B. melaninogenicus	coccobacilli	-	+	+	+*
F. fusiforme	long rods, pointed ends	-	-	-	-
D. pneumosintes	minute rods	-	+	-	-

*Usually takes from three to five days of incubation.

การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

(Direct Microscopic Method)

เป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วไป โดยเฉพาะ American Public Health Association ซึ่งสามารถตรวจสอบ

1. จำนวนและแยกชนิดของแบคทีเรีย
2. ขนาด รูปร่าง และการเรียงตัวของแบคทีเรีย
3. จำนวนและชนิดของเม็ดเลือดขาวในน้ำนม

อุปกรณ์

1. 0.01 ml pipette or callibrated platinum loop
2. Sterized glass slides ขนาด 2.5x7.5 cm. หรือขนาด 5.0 x7.5 หรือขนาด 5.0x11.5
   Slide ใหม่ควรล้างด้วย
3. Cardboard guide cards
   (Cardboard guide cards เป็นกระดาษแข็งที่มีขนาดเท่าแผ่นสไลด์ แบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาดหนึ่งตารางเซนติเมตร 1- 4 ช่องห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร)
4. Levowitz-Weber(LW) stain (Modified Newman-Lampert stain) มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้
   a. เติม 0.6 g. Certified methylene blue chloride อย่างช้าๆลงใน Flask ขนาด 200 ml ที่มีสารผสมระหว่าง 95% Ethyl alcohol 52 ml กับ Tetrachloethane (Reagent grade) 44 ml แกว่งขวดช้าๆ ให้เข้ากัน

   ข้อควรระวัง : ในการเตรียมสีย้อมนี้ควรสวมถุงมือและเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก Tetrachloethane เป็นสารอันตราย

   b. ตั้งทิ้งไว้ 12 –24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4.4 –7.2 ^{0}C
   c. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 42
   d. เติม Gacial acetic acid 4 ml
   e. เก็บในภาชนะที่สะอาดสามารถป้องกันแสงได้ ปิดให้แน่น (เมื่อมีน้ำหรือสารเคมีปนเปื้อนจะทำให้สีเสื่อมสภาพ) และเก็บในที่ที่มีอากาศถ่ายเท

วิธีทดสอบ

1. ก่อนสเมียร์ตัวอย่างต้องอุ่นน้ำนมใน Water bath อุณหภูมิ 40 ^{0}C (ไม่ควรเกิน 10 นาที) เขย่าตัวอย่างน้ำนมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (เขย่าเบา ๆ 25 ครั้ง) ใช้ Pipette ดูดนมมา 0.01 ml เช็ดนมส่วนเกินด้านนอกของ tip แล้วหยดลงบน Slide ที่เตรียมไว้โดยมี Cardboard guide cards รองไว้ข้างใต้ เกลี่ยน้ำนมให้เป็นแผ่นบาง ๆ (Film) ขนาดหนึ่งตารางเซนติเมตร (1 cm^3) ทำให้แห้ง ไม่ควรใช้ไฟเผาโดยตรง และระวังอย่าให้ปนเปื้อนฝุ่น
2. นำสไลด์ไปย้อมสี (ขั้นตอนย้อมสีควรทำในตู้ดูดควัน) หยดสี LW ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งให้แห้ง (2 นาที) เช็ดสีส่วนเกินที่ขอบตารางด้วยกระดาษซับหรือทิชชู จากนั้นทิ้งให้แห้งโดยสมบูรณ์
3. หยดน้ำสะอาด (35-45 ^{0}C) เบา ๆ ให้ท่วม เทน้ำออกและทิ้งให้แห้ง (ทำ 3 ครั้ง)
4. ตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วย Oil immersion lens

แบคทีเรีย	ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม
เม็ดเลือดขาว	ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม
โซมาติกเซลล์	ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม
โปรตีน	ย้อมติดสีฟ้าเป็นพื้นหลัง
ไขมัน	เป็นพื้นสีขาวหรือไม่ติดสี
สิ่งสกปรก	ย้อมติดสีเป็นเม็ดสีดำหรือน้ำตาล

หากต้องการเก็บสไลด์ให้หยด Xylene เพื่อล้าง Oil ทิ้งไว้ให้แห้ง และเก็บสไลด์ใส่กล่อง

การคำนวณผลจากการนับ

1. ต้องทราบ Microscopic Factor(MF) คำนวณได้จาก

MF = พื้นที่ที่สเมียร์(mm^2) / πr^2 x ปริมาณน้ำนมที่ใช้ในการสเมียร์

= (10x10) / πr^2 x 0.01 ml

= 10,000 / πr^2

r = รัศมีของ Oil immersion lens(mm.)

2. จำนวนกลุ่มแบคทีเรีย(Number of Clump) ที่นับได้(DMC/ml) คำนวณได้ดังนี้

ค่าเฉลี่ยของแบคทีเรียที่นับได้ต่อพื้นที่ x MF

ตัวอย่างเช่น คำนวณค่า MF ได้ 320,000 และแบคทีเรียที่นับได้ต่อพื้นที่เท่ากับ 10 ดังนั้น จำนวนแบคทีเรียที่นับได้จะเท่ากับ 10x320,000 = 3,200,000

การทดสอบความไวยา

(Antimicrobial Susceptibility Testing)

การทดสอบความไวของยา วิธีนี้เป็นเทคนิคที่เรียกว่า The agar disc diffusion technique เหมาะในการการทดสอบความไวยาต่อแบคทีเรียที่โตเร็ว(The rapidly growing pathogen) ซึ่งทดสอบโดยใช้กระดาษทดสอบยา(Paper disc) ชุบยาปฏิชีวนะที่ทราบชนิดและขนาดของยา จากนั้นวางกระดาษทดสอบยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบความไวของยาชนิดต่าง ๆ ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต หรือมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียจะซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายไปในทุก ๆ ทาง ทำให้เกิดบริเวณที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ บริเวณนั้นเรียกว่า clear zone

จุดประสงค์

เพื่อทราบถึงชนิดของยาที่ควรจะเลือกใช้กับเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ตรวจพบ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. sterile petridish
2. forceps ไม่มีเขี้ยว
3. ตะเกียงแก๊สบุนเสน หรือหัวแก๊ส
4. กระดาษทดสอบยา(Paper disc)
5. Strerile cotton swab
6. Brain heart in fusion broth
7. ไม้บรรทัด
8. Blood agar
9. Muller-Hilton agar

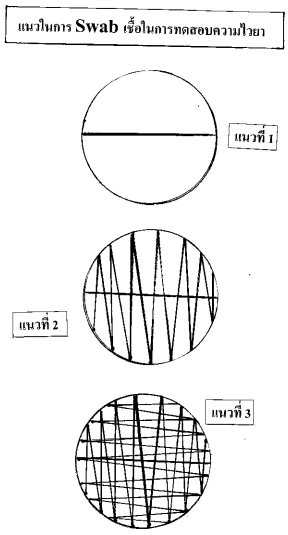
วิธีการ

1. ใช้ loop ที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว ตักเชื้อที่ต้องการทดสอบความไวยามา 1 loop จากนั้นเขี่ยลงใน Brian heart in fusion- broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C นานประมาณ 4 ชั่วโมง

ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบความไวยา

เขี่ย เชื้อลงใน Brian heart in fusion- broth

2. เมื่อสังเกตว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ขุ่นมากขึ้น ให้นำมาทดสอบความไวยา โดยเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้เชื้อกระจายทั่ว ๆ ใช้ sterile swab จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วนำมาเกลี่ยให้เต็มพื้นที่ของอาหารเลี้ยงเชื้อดังรูป และในขั้นตอนสุดท้ายให้ใช้ cotton swab ปาดของเหลวตามแนวขอบของจานเลี้ยงเชื้อเพื่อป้องกันของเหลวที่ติดอยู่ที่ขอบของจานเลี้ยงเชื้อ จะไหลเข้ามาในพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำให้เชื้อเจริญไม่เสมอกัน และเมื่อทำเสร็จแล้วให้ทำซ้ำใน plate เดิมอีก 1 รอบ เพื่อให้มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากพอ



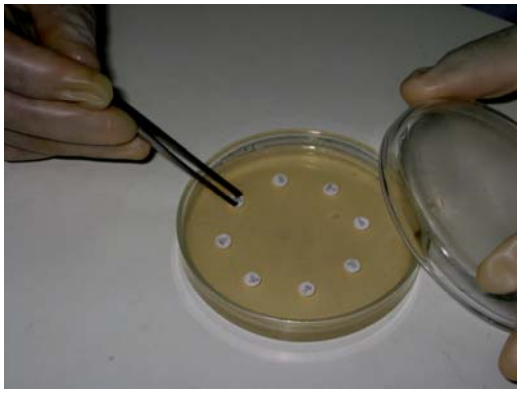
Sterile swab จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แล้วนำมาเกลี่ยให้เต็มพื้นที่ของอาหารเลี้ยง

3. วางกระดาษทดสอบยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เขี่ยเชื้อเรียบร้อยแล้วดังรูป

(a)

(b)

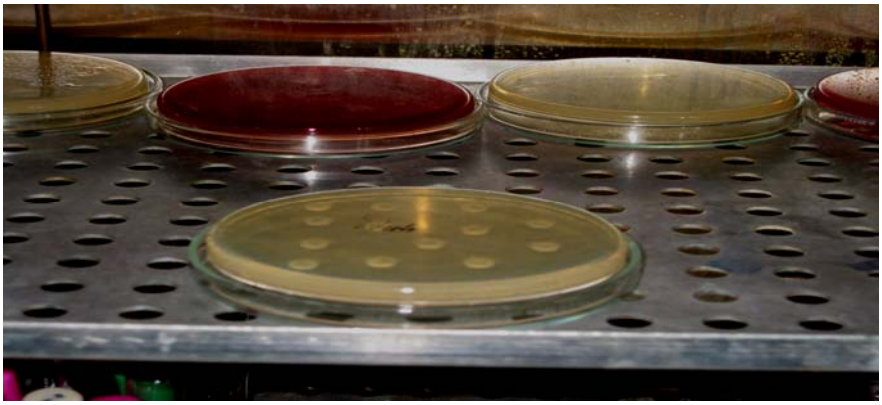
(c)



(d)

วางกระดาษทดสอบยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

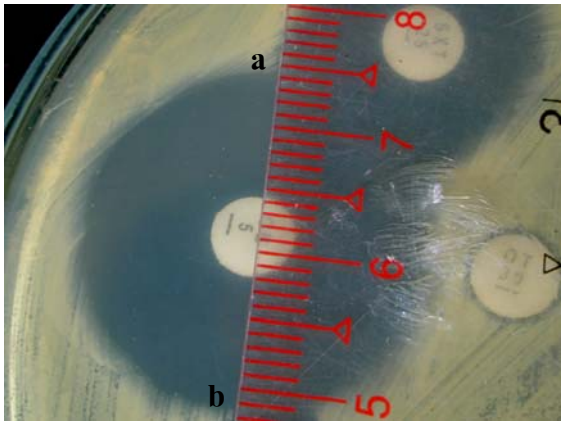
4. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง



บ่มที่ 37 อุณหภูมิเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

5. อ่านผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone (Clear zone) ในการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone ต้องให้แนวในการวัดผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษทดสอบยา

หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จะพบ Clear zone



การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ zone ต้องให้แนวในการวัดผ่าน กลางของกระดาษทดสอบยา จากรูปวัด a-b ได้ 26 cm

การแปลผลจาก Clear zone ที่วัดได้เทียบได้จากตารางมาตรฐาน มีดังนี้

(1) Susceptible หมายถึง เชื้อแบคทีเรียตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะที่รักษา และขนาดยาที่ใช้ในระดับปกติ

(2) Moderately susceptibility หมายถึง ยาปฏิชีวนะจะสามารถยับยั้งเชื้อได้ ถ้ายานั้นสามารถเข้าไปถึงบริเวณที่ติดเชื้อ และมีความเข้มข้นสูงพอ(physiologically concentrated)

(3) Intermediate หมายถึง ยาที่ใช้รักษาให้ผลได้ไม่แน่นอน อาจต้องทดสอบยาชนิดนี้อีกครั้ง

(4) Resistant หมายถึง ยาที่ใช้รักษานี้ไม่สามารถทำลายเชื้อนี้ได้

จากภาพสมมุติว่าเป็นกระดาษทดสอบยาเป็นยาชื่อ Methicilin 5 mcg และกระดาษทดสอบยานี้มีรหัส(Disk code) ME5 และวัด clear zone ได้ 26 mm เมื่อเทียบค่าจากตารางจะอยู่ในช่วง Susceptible (≥14 mm) เชื้อที่เพาะได้จากตัวอย่างน้ำนมนี้มีความไวต่อยา Methicilin ดังนั้นเมื่อใช้ยานี้รักษาจะสามารถทำลายเชื้อนี้ได้

6. รายงานผลโดยเทียบกับตารางแสดงระดับความไวยาของยาแต่ละชนิด

ตารางมาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อต่อ antibiotic ชนิดต่าง ๆ

Antimicrobial Agent	INTERPRETIVES STANDARDS				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	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		11		12-13	14
Organisms					
When testing staphylococci		20		21-28	29
When testing Hacmophilus and staphylococci		19			20
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 Staphylococcin		11		12-14	15
When testing Hacmophilus		19			20
Apriamycin 15 mcy (veterinary)	AP 15	11	12-14		15
Azlocillin 75 mcg when testing Pseudomonas	AZ 75	17			18
Axtreonam 30 mcg	ATM 30	15		16-21	22
When testing Haemophilus					26
Bacitacin 10 units	B 10	8	9-12		13
Carbenicillin 100 mcg	CB 100				
When testing other gram-negative organisms		17		18-22	23
When testing Pscudomonas		13		14-16	17
Cefaclor 30 mcg	CEC 30	14		15-17	18

Antimicrobial Agent	INTERPRETIVES STANDARDS				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
When testing Haemophilus		18	19-23		24
Cefamandole 30 mcg	MA 30	14		15-17	18
When testing Haemophilus		20	21-23		24
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	CFC 75	15		16-20	21
Cefotazime 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
Cefotetan 30 mcg	FOX 30	14		15-17	18
When thesting N. gonorrhoeae		23	24-27		28
Ceffazidime 30 mcg	CAZ 30	14		15-17	18
When testing Haemophilus					269
When testing N. gonorrhoeae					31
Ceftiofur 30 mcg (veterinary)	XNL 30	19	20-23		24
Cefizoxime 30 mcg	ZOX 30	14		15-19	20
When testing Haemophilus					26
Cefriaxone 30 mcg	CRO 30	13		14-20	21

Antimicrobial Agent	INTERPRETIVES STANDARDS				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
When testing Haemophilus					26
When testing N. gonorrhoeae					35
Cefuroxime 30 mcg (Sodium)	CXM 30	14		15-17	18
When testing Hacmophilus		20	21-23		24
When testing N. gonorrhoeae		25		26-30	31
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	CC 2	14	15-16		17
Cloxacillin 1 mcg	CX 1	10	11-12		13
Colisttin 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	10	11-14		15
Erythromycin 15 mcg	E 15	13	14-17		18
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		14
Meziocilln 75 mcg	MZ 75				

Antimicrobial Agent	INTERPRETIVES STANDARDS				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
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 3	12	13-16		17
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		20	21-28		29
When testing enterococci		14		15	
When testing L. monocytogenes		19			20

Antimicrobial *Agent*	INTERPRETIVES STANDARDS				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
When testing non-enterococcal streptococci		19		20-27	28
When testing N. gonorrhoeae		26		27-46	47
Piperacillin 100 mcg	PIP 100				
When testing Pscudomonas		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	24			25
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
Tetracycline 30 mcg	TE 300	14	15-18		19
When testing Hacmophilus		25	26-28		29
When testing N. gonorrhoeae		30		31-37	38
Ticarcillin 75 mcg	TIC 75				
Whent testing Pseudomonas		14			15
When testing other gram-negative organisms		14		15-19	20
Ticarcillin 75 mcg/Clavulanic Acid 10 mcg	TIM 85				
When testing Pseudomonas		14			15
When testing other gram-negative organisms		14		15-19	20
Tobramycin 10 mcg	TM10	12	13-14		15
Trimetroprim 5 mcg urinary tract specific	TMP 5	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	17	17	

Antimicrobial Agent	INTERPRETIVES *STANDARDS*				
	Disk Code	Resistant (mm or less)	Intermediate (mm)	Moderately Susceptible (mm range)	Susceptible (mm or more)
When testing other gram-negative organisms		9	10-11		12
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 other gram-negative organisms		14		15-19	20
Ticarcillin 75 mcg/Clavulanic Acid 10 mcg	TIM 85				
When testing Pseudomonas		14			15
When testing other gram-negative organisms		14		15-19	20
Tobramycin 10 mcg	TM 10	12	13-14		15
Trimetroprim 5 mcg urinary tract specific	TMP 5	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 organisms		9	10-11		12

การตรวจสอบยาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโคโดยวิธีโยเกิร์ตเทสต์ KU-NP-Ab1

หลักการ

โยเกิร์ตเทสต์ (KU-NP-Ab1) เป็นชุดตรวจสอบกรอง (Screening test) ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมโค ชุดตรวจสอบนี้ใช้หลักการยับยั้งการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ (Microbial inhibition tests) คือการตรวจโดยใช้แบคทีเรียชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ หรือ ยาต้านจุลชีพเป็นตัวทดสอบ โดยผสมเชื้อแบซิลลัส สเตียโรเทอร์โมฟิลัส(Bacillus sterothermophillus) ในสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้วบรรจุในหลอด(Tube)

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจหายาปฏิชีวนะตกค้างในน้ำนมที่ต้องเตรียมในห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

1. วอเตอร์บัธ(water bath)
2. หลอดแก้ว(Tube) หรือหลอดพลาสติกพีพี ขนาดเส้น ผ่าศูนย์กลางประมาณ 11X40 มม.
3. ไปเปต ขนาด 1 ซีซี. หรือไปเปตอัตโนมัติ
4. ที่หยดสารเคมี(Dropper)
5. เชื้อโยเกิร์ตเทสต์ KU-NP-Ab1
6. Bromocresol purple
7. ที่ใส่หลอดแก้ว(Rack)
8. กระดาษตะกั่ว (กระดาษ Foil)
9. เตาแก๊ส พร้อมหม้อต้มน้ำ 1 ชุด
10. เทอร์โมมิเตอร์
11. เดลโว เทสต์ (Delvo test)
12. ปากกาเขียนหมายเลขข้างหลอด

การเก็บรักษา

ควรเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5-10°C และควรใช้ก่อนหมดอายุตามที่ระบุ (2 เดือนจากวันผลิต)

วิธีการทดสอบ

ชุดทดสอบโยเกิร์ตเทสต์ KU-NP-Ab-1

1. นำตัวอย่างน้ำนมไปต้มที่อุณหภูมิ 98±2°C นาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วดูดน้ำนมที่ต้มแล้วมาใส่หลอด ๆ ละ 1 มล.

2. จากนั้นใส่โยเกิร์ต หลอดละ 2 หยด แล้วหยดด้วยสี Bromocresol purple 1 หยด เขย่าให้สารละลายเข้ากันดี ปิดด้วยฝาหลอด

ใส่โยเกิร์ต 2 หยด

หยด Bromocresol purple 1 หยด

3. แล้วนำไปอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 65±2°C หลังจากอุ่นชุดตรวจสอบ 6 ชั่วโมง 30 นาที นำชุดตรวจสอบที่ใส่น้ำนมไม่มีสารต้านจุลชีพมาอ่านก่อน ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้อ่านผลการทดสอบได้ ถ้าสียังไม่เป็นเป็นสีเหลืองทั้งหมดให้ทำการอุ่นต่ออีก 15 นาที แล้วนำมาอ่านผล ถ้าสีของชุดตรวจสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมไม่มียาปฏิชีวนะตกค้าง และถ้าสีของชุดตรวจสอบยังคงเป็นสีม่วงแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมมียาตกค้าง แต่ถ้าสีของชุดตรวจสอบเป็นสีม่วงด้านบนและมีสีเหลืองด้านล่างหรือสีม่วงจางลงแต่ไม่เป็นสีเหลืองแสดงว่าตัวอย่างน้ำนมที่มียาตกค้างในปริมาณต่ำกว่าความเข้มข้นที่ชุดตรวจสอบยาปฏิชีวนะสามารถตรวจพบ

ในกรณีที่ทำการตรวจในช่วงบ่าย หรือช่วงเย็นสามารถอ่านผลในช่วงเวลา 09.00-10.00 น. ของวันถัดมาได้ เมื่อพบตัวอย่างใดที่มียาปฏิชีวนะตกค้างให้ตรวจซ้ำด้วยวิธีเดลโวเทสต์ (Delvo test) อีกครั้งหนึ่ง

ใส่ตัวอย่างนม 1 ml นำไปอุ่นที่ water bath อุณหภูมิ 65±1 °C

ผลการทดสอบ

การตรวจหาปริมาณไขมันนม(Milk fat) โดย Gerber Butterfat Test

ไขมันนมเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดราคาน้ำนมดิบแก่เกษตรกร และการทราบปริมาณไขมันนมที่ถูกต้องจะสะดวกในการปรับมาตรฐานไขมันนมก่อนการแปรรูปในอุตสาหกรรมต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประกอบการจัดการด้านโภชนาการของฟาร์มโคนมในการผลิตน้ำนมดิบคุณภาพดี

เครื่องมือและสารเคมี

1. Gerber butyrometer 0-6% หรือ 0-8 %
2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง(Gerber Centifuge)
3. จุกยาง(Rubber stoppers) สำหรับปิด Gerber butyrometer
4. Pipetts สำหรับดูดตัวอย่างนมขนาด 11 ml
5. Pipetts ขนาด 1 ml สำหรับดูด Amyl alcohol
6. ที่ตั้ง (Stand) สำหรับวาง butyrometer
7. Rack
8. Sulfuric acid 1.815 g/ml
9. Amyl alcohol

วิธีทดสอบ

1. เติม Sulfuric acid 10 ml ลงใน Gerber butyrometer จากนั้นค่อยๆเติมตัวอย่างนมที่จะทดสอบ 10.94 ml หรือ 11 ml ระวังอย่าให้บริเวณคอของ Gerber butyrometer เปียก เพราะจะมีปัญหาเกี่ยวกับการปิดจุกจะหลุดออกง่าย(Sulfuric acid จะช่วยละลายโปรตีนนม และช่วยลดความหนืดของ fat globule membrane และลอยตัวขึ้น)

Gerber butyromete

เติม Sulfuric acid 10 ml

ค่อย ๆ เติมตัวอย่างน้ำนมที่จะทดสอบ 10.94 ml

2. เติม Amyl alcohol 1 ml (ช่วยป้องกันการไหม้ของไขมัน) ปิดจุกยางให้แน่น

เติม Amyl alcohol 1 ml

3. เขย่า Butyrometer ให้น้ำนมละลายโดยถือทางด้านฝาขวดขึ้น ให้ระวังขวดจะร้อนมาก

เขย่า Butyrometer ให้น้ำนมละลาย

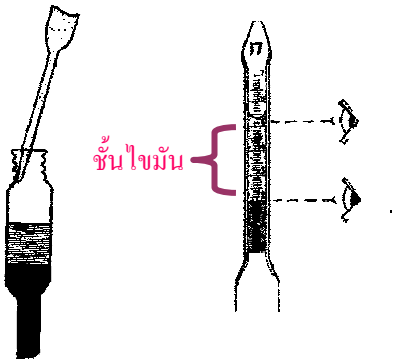
4. ให้ถือ Butyrometer บริเวณคอและปากขวด แล้วเอียงไปมา 10 ครั้ง เพื่อให้กรดผสมกับน้ำนมอย่างทั่วถึง

5. วาง Butyrometer ใน rack แช่ใน Water bath อุณหภูมิ 65 ^{0}C จนกระทั่งเตรียมเครื่องปั่นเรียบร้อยแล้ว นำไปปั่นนาน 5 นาที ที่ความเร็ว 1100 rpm

นำไปปั่นนาน 5 นาที ที่ความเร็ว 1100 rpm

6. นำออกจากเครื่องปั่น แช่ใน Water bath อุณหภูมิ 65 ^{0}C นาน 5 นาทีโดยให้ด้านฝาปิดของ Butyrometer อยู่ด้านล่าง ดังนั้นส่วนของชั้นไขมัน(Fat columnn) จะอยู่เหนือน้ำและต้องตั้ง Butyrometer ให้ตรง

7. อ่านผล ในระดับสายตาตรงตำแหน่งต่ำสุดของจุดโค้ง(Meniscus) ของชั้นไขมัน (Fat column) ตำแหน่งล่างอยู่ตรงเลข 0 ค่าที่อ่านได้เป็น % โดยน้ำหนักของไขมันในน้ำนม



อ่านผล ในระดับสายตาตรงตำแหน่งต่ำสุดของจุดโค้ง(Meniscus) ของชั้นไขมัน(Fat column) ตำแหน่งล่างอยู่ตรงเลข 0

ลักษณะที่ควรพบหลังจากการปั่นแล้วคือ

- สีของชั้นไขมันควรมีสีเหลืองเหมือนสีฟางข้าว
- ส่วนปลายของชั้นไขมันต้องชัดเจน
- ชั้นไขมันต้องแยกจากตะกอน
- น้ำที่อยู่ใต้ชั้นไขมันต้องใส

ปัญหาที่อาจพบในการทดสอบ

1. สีของชั้นไขมันจางมากเนื่องจาก
    - อุณหภูมิ หรือกรดน้อยเกินไป
    - กรดอ่อนเกินไป(Acid too weak)
    - ผสมนมและกรดไม่เข้ากัน
2. สีของชั้นไขมันเข้มเกินไปเนื่องจาก
    - อุณหภูมิ หรือกรดมากเกินไป
    - กรดแก่เกินไป(Acid too strong)
    - ผสมนมและกรดช้าเกินไป
    - ใช้กรดมากเกินไป

เอกสารอ้างอิง

วิพิชญ์ ไชยศรีสงคราม. การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม

วรรณา ตั่งเจริญชัย (2538). ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรและเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อรรถยา เกียรติสุนทร โอภาส วงศ์นิติพัฒน์ และ สุวิมล พันธุ์ดี (2544). คุณภาพน้ำนมเรื่องน่ารู้ เอกสารคำแนะนำกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

American Public Health Association. 1985. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Assn., New York.

C.B.O. Connor (1995) Rural Dairy Technology International Livestock Research Institute Addis Abba Ethiopia.

FAO/TCP/KEN/6611 Project. Milk Processing Guide Series Vole. Training Programe for Small Scale Dairy Sector and Dairy Training Institute-Naivasha.

G.W. Osbaldiston (1973) Laboratory procedures in clinical veterinary bacteriology University park Press

P.J. Quinn, M.E. Carter B.K. Markey and G.R. Carter (1994) Clinical Veterinary. Microbiology Mosby-Year Book Europe Limited

U.S. Food & Drug Administration Conter for food Safety & Applied Nutrition (2001). Bacteriological Analytical Method online