บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

1. กลุ่มการศึกษา

กลุ่มประชากร (population) ที่นำมาศึกษาเป็นผู้ป่วยที่มีอาการช่องคลอดอักเสบ (non - specific vaginitis) ซึ่งมารับการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอกแผนกสูติ - นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนเมษายน 2530 ถึงเดือนกันยายน 2530

การสัมภาษณ์ผู้ป่วยทำโดยผู้ศึกษา ซึ่งเป็นข้อมูลเกี่ยวกับประวัติส่วนตัว (personal history) ประวัติเพศสัมพันธ์ (history of STD) และอาการ (symptoms) ต่าง ๆ ของการติดเชื้อในระบบอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น การตกขาว (leucorrhoea) มากกว่าปกติ, ตกขาวมีกลิ่นผิดปกติ (malodour), อาการคัน (vaginal itching), ปัสสาวะแสบ (dysurea) และการมีเลือดออกภายหลังร่วมเพศ (vaginal bleeding)

เกณฑ์การเลือกผู้ที่จะนำเข้ามาในการศึกษา

1. มีอาการตกขาวมากกว่าปกติ ไม่จำกัดว่ามีมานานเท่าไร, ไม่มีไข้ (อุณหภูมิน้อยกว่า 37.3 °ซ)

2. มีอาการอื่นร่วมด้วย คือ แสบหรือคัน และ/หรือ ระคายเคืองในช่องคลอด และ/หรือ ปัสสาวะแสบ

3. ไม่จำกัดอายุ

4. ตรวจไม่พบเชื้อรา (*Candida albicans*) และ/หรือ เชื้อปาราสิต (*Trichomonas vaginalis*) เมื่อดูสด (wet mount preparation) จากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากบริเวณช่องคลอด

5. ตรวจไม่พบเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เมื่อย้อมสิ่งส่งตรวจด้วยวิธีย้อมแกรม

6. สภาวะความเป็นกรด - ด่าง ของสิ่งคัดหลั่งของช่องคลอด (vaginal discharge) มากกว่า 4.5

7. ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลา 4 สัปดาห์เป็นอย่างต่ำ

<u>เกณฑ์ที่ไม่เลือกผู้ที่จะนำเข้ามาในการศึกษา</u>

1. อุณหภูมิตั้งแต่ 37.3 °ซ ขึ้นไป อาจมีปวดท้องน้อย แสดงว่ามีการอักเสบในอุ้งเชิงกราน

2. กำลังมีประจำเดือน

3. ผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Trichomonas vaginalis* หรือเชื้อ *Candida albicans* หรือทั้ง 2 เชื้อเมื่อดูสด (wet mount preparation) จากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากบริเวณช่องคลอด และ/หรือพบเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* เมื่อย้อมดูด้วยวิธีการย้อมแกรม

4. ได้รับยาปฏิชีวนะต่ำกว่า 4 สัปดาห์

2. <u>กลุ่มควบคุม</u>

เป็นกลุ่มสตรีปกติที่มาหน่วยวางแผนครอบครัวแผนกสูติ-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2530 ถึงเดือนตุลาคม 2530 จำนวน 51 ราย หลักเกณฑ์การเลือกคือ

1. ไม่มีอาการตกขาว

2. ไม่จำกัดอายุ

3. สภาวะความเป็นกรด-ด่างของสิ่งคัดหลั่งของช่องคลอด (vaginal discharge) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.5 (Willis 1983, Thomason et al. 1984)

3. การเก็บและนำส่งตัวอย่าง (Gastrin et al.1968)

แพทย์เป็นผู้เก็บสิ่งตรวจจากช่องคลอดของผู้ป่วยช่องคลอดอักเสบและคนปกติ โดยใช้ swab ที่ต้มด้วย Sorensen's buffer solution pH 7.4 เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องอบนึ่งไอน้ำอุณหภูมิ 121 °ซ นานประมาณ 15 นาที อบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนอุณหภูมิ 160 °ซ นาน 15-30 นาที ป้ายบริเวณผนังช่องคลอด (vaginal wall) ตำแหน่ง posterior fornix จำนวน 2 swab (สำหรับเพาะเชื้อ *Mobiluncus* และเชื้อ *Gardnerella vaginalis*) swab อันหนึ่งเพาะเชื้อโดยตรงลง Columbia CNA agar เพื่อที่จะรักษาสภาวะให้มีออกซิเจนน้อยที่สุด ป้องกันมิให้เชื้อตายขณะรอส่งห้องปฏิบัติการ จึงใส่ในกระป๋องที่อัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไว้ก่อนแล้วและจุดเทียนก่อนปิดกระป๋องอีกครั้งหนึ่ง เพื่อลดปริมาณออกซิเจนในกระป๋อง รอสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยรายอื่นทำเช่นนี้จนครบนานประมาณ 1/2 - 1 ชั่วโมงนำไปใส่ในแอนแอโรบิคจาร์ใช้ gas pak (BBL) ทำให้เกิดบรรยากาศไร้ออกซิเจน นำไปบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 °ซ swab อีกอันหนึ่งใส่ลงในหลอด modified Stuart's transport medium เพื่อนำไปเพาะเชื้อใน Columbia CNA media ซึ่งทำเป็น secondary plating เพื่อเปรียบเทียบวิธีการนำสิ่งส่งตรวจและ HBT medium เพื่อเพาะเชื้อ *Gardnerella vaginalis* การเพาะเชื้อแอนแอโรบิคจาร์ ทำภายในเวลา 2 - 4 ชั่วโมง บ่มเชื้อแอนแอโรบส์ในสภาวะไร้ออกซิเจน และบ่มเชื้อ *G. vaginalis* ใน candle jar

วิธีอ่านผล สถิติปริมาณ (semiquantitative)จากจานเพาะเชื้อที่ streak แยกเชื้อโดยแบ่งจานเพาะเชื้อเป็น 4 quadrants (Finegold et al. 1986)

0 ไม่มีเชื้อขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1+ เชื้อขึ้นใน quadrant ที่ 1 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2+ เชื้อขึ้นใน quadrant ที่ 1, 2 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3+ เชื้อขึ้นใน quadrant ที่ 1, 2, 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

I17446770X

4+ เชื้อขึ้นใน quadrant ที่ 1, 2, 3, 4 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ศึกษาสิ่งส่งตรวจโดยตรง

4.1 ตรวจสด ดูเชื้อ *Candida albicans* และ *Trichomonas vaginalis* และดู clue cell

หยดน้ำเกลือนอร์มัลความเข้มข้นร้อยละ 0.9 และ KOH ความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงบนสไลด์ แพทย์ใช้swabที่ไม่ได้ย้อมใน Sorensen's buffer ป้ายสิ่งคัดหลั่งจากตำแหน่ง posterior fornix ป้ายลงในหยดน้ำยาทั้ง 2 ตามลำดับ ปิดด้วยแผ่นกระจก ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หาเชื้อ *Trichomonas vaginalis* และ clue cell จากบริเวณที่หยดน้ำเกลือนอร์มัล และหา hyphae ของเชื้อราจากบริเวณที่หยด KOH

วิธีอ่านผลสถิติปริมาณ (semiquantitative) ของ clue cell จากสิ่งคัดหลั่งของช่องคลอดที่ป้ายบนสไลด์ที่หยดน้ำเกลือนอร์มัลความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว high (40)

0 เท่ากับไม่พบ clue cell เลย

1+ เท่ากับ 1-10 เซลล์/2 high-power field

2+ เท่ากับ 11-20 เซลล์/2 high-power field

3+ เท่ากับ 21-30 เซลล์/2 high-power field

4+ เท่ากับ >30 เซลล์/2 high-power field

4.2 ย้อมสีเกรม ดูเชื้อgram negative diplococci, เชื้อ curved rods, และ เชื้อ *Lactobacillus*

แพทย์ใช้swabป้ายสิ่งคัดหลั่งจากตำแหน่ง posterior fornix และ endocervix จำนวน 2 swab ป้ายบนแผ่นสไลด์ 2 แผ่นตามลำดับ นำส่งไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อย้อมสีเกรม

4.3 วัดสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอดผู้ป่วยช่องคลอดอักเสบและคนปกติ จาก speculum, ใช้กระดาษวัด pH (pH indicator paper) ของ E.Merck, D-6100 Dermstadt range 3.8-5.4 และ range 5.4-7.0 โดยแตะสิ่งคัดหลั่งและนำมาเปรียบเทียบสีกับมาตรฐาน

5. ศึกษาการแยกเชื้อ *Mobiluncus*

5.1 การศึกษาโคโลนีบนมีเดีย Columbia CNA agar หลังการอบ 48 ชั่วโมง นำมาส่องดูโคโลนีด้วยกล้อง Stereoscopic microscope ดูลักษณะโคโลนีที่มีรูปร่างสัณฐาน ดังนี้โค้ง (convex), สีขาว-เหลือง, glossy วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีได้เท่ากับ 1-2 มม. โคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวให้ subculture บน Columbia CNA agar ต้องทำภายในเวลา 2-4 ชั่วโมง หลังจากป้ายสิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอดของผู้ป่วยและคนปกติแล้ว, บ่มในเอนแอโรบิค-จาร สภาวะไร้ออกซิเจน ในตู้อบ 37 °ซ นาน 48-72 ชั่วโมง และย้อมสีเกรมเพื่อดูลักษณะสัณฐานเซลล์ ถ้าพบเป็นรูปแท่งโค้งติดสีเกรมลบหรือติดสีเกรมไม่แน่นอน มีรูปร่างโค้งยาวเรียวขนาด 4 ไมโครเมตร และรูปร่างสั้นแต่มีส่วนหยักโค้งเล็กน้อยขนาด 1 ไมโครเมตร นำมาศึกษาต่อไป ดูการเคลื่อนที่ของเชื้อซึ่งเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ดูด้วย dark field preparation

5.2 การศึกษาลักษณะสัณฐาน และคุณสมบัติต่าง ๆ

5.2.1 ตรวจสอบเชื้อแท่งโค้ง (comma-shaped rod) ดูลักษณะความโค้งของเซลล์ที่ย้อมจากโคโลนี เพื่อจัดเป็นชนิดตามรูปร่างแบบ long curved rods (LCR) และ short curved rods (SCR) และวัดขนาดของเซลล์ โดยทำดังนี้ นำสไลด์มาตรฐานที่แบ่งเป็นช่องย่อย ๆ โดยแต่ละช่องมีขนาดเท่ากับ 0.01 มม. มาวางบนฐานของกล้องจุลทรรศน์ ส่องดูด้วย objective ขนาดหัว high หยด oil immersion ส่วน eye pieceมีสเกลแบ่งเป็นช่อง ๆ ซึ่งมาเทียบสเกลกับช่องของสไลด์มาตรฐานแล้ว ทำให้ทราบว่า 1 ช่องของ eye

piece เท่ากับ 1 ไมโครเมตร ดังนั้นเมื่อดูสไลด์ที่ย้อมเกรมเชื้อ LCR และ SCR ด้วย objective ขนาดหัว high และหยด oil immersion และใช้ eye piece ที่มีสเกลข้างต้นส่องดูเชื้อ และวัดขนาดเชื้อ

5.2.2 ศึกษาการเคลื่อนไหว เพาะเชื้อ curved rod ใน peptone yeast extract broth (PY) อบที่ 37 °ซ นาน 4 ชั่วโมง หยดบนสไลด์ดูการเคลื่อนไหวด้วยวิธี dark field examination

5.2.3 ศึกษาแฟลาเจลลาเพื่อดูตำแหน่งและจำนวนของแฟลาเจลลา โดยใช้วิธีดังนี้

5.2.3.1 <u>การย้อมสีแฟลาเจลลา (Ryus' flagella stain</u> (Kodaka et al. 1982) สีที่ใช้ย้อมประกอบด้วย <u>solution 1</u> 10 ส่วน (mordant) ผสมกับ <u>solution 2</u> 1 ส่วน (stain) สีที่ใช้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

<u>วิธีย้อม</u>

1. เขี่ยเชื้อจากโคโลนี (colony) โดยอย่าให้โดนเนื้อ agar แตะเบา ๆ บนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่น 2 หยด
2. ปล่อยให้หยดน้ำและเชื้อแห้งเองที่อุณหภูมิห้อง ห้ามทำให้แห้งโดยการลนไฟ (dry-heat) เพราะจะทำให้รูปร่างของเชื้อผิดไป
3. เทสีให้ท่วมนาน 5 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา 2-3 นาที
4. ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว oil immersion

5.2.3.2 <u>ศึกษาแฟลาเจลลาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน</u> (Hayat, 1972) ใช้น้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อ *Mobiluncus* ประมาณ 3 loop เขย่าเบา ๆ ให้เชื้อกระจายในน้ำยา ใช้ pasteur pipette ดูดแล้วหยดบนแผ่นเทียน (dental wax) คว่ำ grids ที่เคลือบด้วยฟิล์มพลาสติก (colloidoin) และคาร์บอนบนหยด fixative ที่มี

เชื้อผสมอยู่นาน 5 นาที ใช้ปากคีบ (forcep)คีบ grids ตรงบริเวณริม ๆ ซับหยดน้ำด้วยกระดาษ whatman โดยแตะบริเวณข้าง ๆ grids ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นย้อมด้วย Phosphotungstic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยคว่ำแผ่น grids ที่ทำไว้บนหยดสีบนแผ่นเทียน (dental wax) นาน 5 นาที ใช้ปากคีบคีบ grids ซับหยดสีด้วยกระดาษ whatman ทิ้งไว้ให้แห้งและเก็บ grids ไว้ใน dessicator ระหว่างที่รอดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

5.3 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทุกชนิด เติมซีรัมกระต่ายร้อยละ 2 ยกเว้น starch, maltose หรือ trehalose วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ง

5.3.1 ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต (Spiegel et al. 1984)

ใช้ peptone yeast extract medium (PY) เป็นมีเดียพื้นฐาน (base medium) เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ให้ได้สัดส่วนตามตารางที่ 22 ได้แก่น้ำตาล dextrose, sucrose, mannitol, fructose, maltose, xylose, arabinose, salicin, rhamnose, esculin, trehalose, lactose, inositol, mannose, raffinose, adonitol, starch, inulin

ใส่เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่เตรียมใหม่ๆ ปิดฝาจุกเกลียวให้แน่น บ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลโดยการหยด methyl red ใน broth (pH ของ methyl red ระหว่าง 4.4-6.2) (Cowan, 1974) อ่านผลทันที อ่านผลบวกเมื่อได้สีแดงหรือสีชมพู อ่านผลลบเมื่อเป็นสีเหลือง

5.3.2 Starch hydrolysis (Vera et al. 1980)

ใส่เชื้อใน broth แล้วบ่มเชื้อในสภาวะไร้อ็อกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลโดยการเติม gram iodine 2-3 หยดใน broth อ่านผลบวกเมื่อไม่มีสี เพราะ starch ถูกไฮโดรไลท์หมดแล้ว ถ้าผลลบจะให้สีน้ำเงินเข้ม

5.3.3 Nitrate reduction (Holdeman et al. 1977)

เพาะเชื้อใน broth บ่มในสภาวะไร้อ็อกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลโดยการเติม solution A (sulfanilic acid in acetic acid) 1 มล.และ solution B (dimethyl-alpha-naphthylamine in acetic acid) 0.5 มล. อ่านผลบวกเมื่อเป็นสีแดง เพราะได้สาร nitrite อ่านผลลบเมื่อไม่มีสีเลยช่วง 2-5 นาที เมื่อเติมผงสังกะสีจะได้สีแดง ซึ่งเป็นการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นอย่างสมบูรณ์

5.3.4 Esculin hydrolysis (Holdeman et al. 1977)

เพาะเชื้อใน broth บ่มในสภาวะไร้อ็อกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน ดูผลโดยการเติม ferric ammonium citrate ความเข้มข้นในน้ำร้อยละ 1 อ่านผลทันที อ่านผลบวกเมื่อเกิดสีน้ำตาลดำ และอ่านผลลบเมื่อเป็นสีเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

5.3.5 H_2S production (Holdeman et al.1977)

เพาะเชื้อใน H_2S medium แล้วใส่กระดาษชุบสารละลาย lead acatate อยู่เหนือมีเดียดังกล่าว ปิดจุกให้แน่น แล้วบ่มเชื้อในสภาวะไร้อ็อกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลโดยดูการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบนกระดาษชุบ lead acetate

5.3.6 การเจริญในมีเดียที่มี bile, ความเข้มข้นร้อยละ 20 (Holdeman et al.1977)

เพาะเชื้อใน broth บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลบวกเมื่อ broth ขุ่น ส่วนผลลบ broth จะใส

5.3.7 ทดสอบ Catalase

เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่จะทดสอบ ป้ายบนแผ่นสไลด์ หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 อ่านผลบวกเมื่อมีฟอง เกิดขึ้น ส่วนผลลบจะไม่มีฟอง

5.3.8 ทดสอบ Oxidase

เขี่ยเชื้อป้ายบนกระดาษกรอง whatman No. 1 หยด tetramethyl-p-phenylenediamine ความเข้มข้นร้อยละ 1 อ่านผลทันที ผลบวกให้สีม่วงเข้ม ส่วนผลลบจะเป็นสีเดิมของน้ำยา

5.3.9 การ hydrolysis ของ sodium hippurate solution ความเข้มข้นในน้ำร้อยละ 1 (Hwang et al. 1975)

ใส่เชื้อใน sodium hippurate solution บ่มเชื้อที่ water bath อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง เติม ninhydrin 3 หยด ดูผลหลังจากบ่มเชื้ออีกครั้งหนึ่ง นาน 20 นาที ห้ามเขย่า อ่านผลบวกเมื่อได้สีม่วง ผลลบจะเป็นสีเหลืองอ่อนของ ninhydrin

5.3.10 Motility

เพาะเชื้อใน motility medium บ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน ดูผลถ้ายังลบ บ่มเชื้อต่อไปจนครบ 14 วัน ดูผลครั้งสุดท้ายว่า อ่านผลบวกเมื่อมีเดียมีความขุ่นออกมาจากรอยแทงของ needle

5.3.11 การทดสอบ β-D-galactosidase (ONPG) test (Lowe, 1962)

เพาะเชื้อใน peptone yeast extract broth (PY) ที่มี ONPG บ่มเชื้อในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลบวกเมื่อได้สีเหลืองเข้ม ผลลบจะได้สีเหลืองอ่อนแบบเดียวกับ broth

5.3.12 การย่อย Gelatin (Kohn, J, 1953)

เพาะเชื้อใน peptone yeast extract broth (PY) และมีแผ่น gelatin ซึ่งมีผงถ่านผสมอยู่ ขนาด 1 x 0.5 ซม. บ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน อ่านผลบวกเมื่อมีผงถ่านละลายออกมาใน broth เนื่องจาก gelatin ถูกเชื้อย่อยเก็บต่ออีก 30 วัน

5.3.13 Indole production

เพาะเชื้อใน PY broth บ่มเชื้อในสภาวะไร้อ็อกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 3 วัน หยด Ehrlich's reagent อ่านผลถ้าผลลบจะได้สีเหลือง ถ้าผลบวกจะได้สีแดงหรือสีชมพู

6. <u>ศึกษาการแยกเพาะเชื้อ *Gardnerella vaginalis*</u>

6.1 การศึกษาโคโลนีบน HBT medium หลังจากอบ 48 ชั่วโมงใน candle jar อุณหภูมิ 37 °ซ ดูลักษณะโคโลนีด้วยตาเปล่า โคโลนีมีขนาดเล็ก ขุ่นขาว มีการสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์รอบ ๆ โคโลนี

6.2 ศึกษาลักษณะรูปร่างสัณฐาน

เชื้อ *Gardnerella vaginalis* เป็น facultative anaerobic bacteria ย้อมสีเกรมได้เป็นรูปคอคโคแบซิลไล ติดสีเกรมไม่แน่นอน

6.3 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ง.

6.3.1 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต (Greenwood et al. 1979)

เป็นส่วนผสมของ Proteose peptone no. 3, phenol red, วุ้น, น้ำ เป็นมีเดียพื้นฐาน (base media) แล้วเติมน้ำตาลที่ผ่านการกรองผ่านกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อที่มีขนาดรูเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เติมน้ำตาลร้อยละ 1 ในมีเดียพื้นฐานได้แก่ glucose, maltose, starch และ mannitol

เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อในสภาวะ facultative anaerobe อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง อ่านผลบวกมีเดียเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง ผลลบเป็นสีส้มเหมือนเดิม

6.3.2 การทดสอบ Catalase

เชื้อโคโลนีของเชื้อ *Gardnerella vaginalis* บน chocolate medium บ้ายบนสไลด์ หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 อ่านผลบวกเมื่อเกิดฟองทันที ผลลบจะไม่มีฟอง

6.3.3 การ hydrolysis ของ sodium hippurate, ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Hwang et al. 1975)

ใส่เชื้อใน sodium hippurate solution, ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มเชื้อ ใน water bath อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง เติม ninhydrin 3 หยด ดูผลหลังจาก บ่มเชื้อ 37 °ซ นาน 20 นาที ห้ามเขย่า อ่านผลบวกเมื่อได้สีม่วง ผลลบจะไม่เปลี่ยนสี

6.3.4 H_2O_2 inhibition (Piot et al. 1983)

เพาะเชื้อ *G. vaginalis* มาก ๆ บน PSD medium ให้ทั่ว แล้วหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1 หยดกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อใน candle jar อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

6.3.5 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ metronidazole (50 ไมโครกรัม/แผ่นยา) และ trimethoprime (5 ไมโครกรัม/แผ่นยา) (Piot et al. 1983)

6.3.5.1 ดูความไวต่อยา metronidazole (50 ไมโครกรัม/แผ่นยา)

เพาะเชื้อ *G. vaginalis* บน PSD medium แล้ววางแผ่นยา บ่มเชื้อใน candle jar อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

6.3.5.2 ทดสอบความไวต่อยา trimethoprim (5 ไมโครกรัม/แผ่นยา)

เพาะเชื้อ *G. vaginalis* บน H agar แล้ววางแผ่นยา บ่มเชื้อใน candle jar อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

7. <u>Minimal Inhibitory Concentration (MIC)</u>

เป็นการหาปริมาณของยาปฏิชีวนะที่น้อยที่สุด ที่สามารถไปยับยั้งบัคเตรีได้ โดยการเจือจางยาในวุ้น แล้ว inoculate เชื้อบนผิวหน้าของมีเดีย เป็นจุด ๆ โดยใช้ multipoint inoculator

ก. หา MIC ของเชื้อ *Mobiluncus*

<u>มีเดีย</u>

ใช้ Columbia blood agar base เสริม (supplement) ด้วยซีรัมของม้า ร้อยละ 2.5 (Skarin et al. 1983)

ยาปฏิชีวนะ (ดูตามภาคผนวก ก)

metronidazole 2560 ไมโครกรัม/มล. โดยละลายในน้ำกลั่น

ampicillin 2560 ไมโครกรัม/มล. โดยละลายใน 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0

tetracycline 2560 ไมโครกรัม/มล. โดยละลายในน้ำกลั่น

การเตรียม plate

ใช้ยาปฏิชีวนะ 2 มล. ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาใน plate ที่หนึ่งเท่ากับ 256 ไมโครกรัม/มล. ใช้ Two fold dilution ของยา 2 มล. ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 18 มล. เช่นนี้ทุก plate ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดทำเช่นเดียวกัน

การเตรียมเชื้อ

บัคเตรีที่เพาะบน plate 48-72 ชั่วโมง เขี่ยมา 1 ลูป ละลายใน brain-heart infusion broth (Difco) โดยใช้ brain-heart broth ที่ต้มไล่ออกซิเจนและทิ้งให้เย็นแล้ว ปรับความขุ่นให้เท่ากับ Mc Farland's Standard No. 0.5 (1.5×10^7 เซลล์/มล.) (Lennette et al. 1980, Sutter et al. 1980)

วิธีทำ

หยดบัคเตรีบน plate ด้วย applicator (Steer et al. 1959) บ่มเชื้อในตู้อบ 37 °ซ โดยใส่ในแอนแอโรบิคจาร์สภาวะไร้

อ็อกซิเจนนาน 48 ชั่วโมง

Control

inoculate เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยาก่อนและหลังทำการทดลองครั้งละ 2 plates, plate หนึ่งอบในตู้อุ่นธรรมดาเพื่อเป็น control ดูการปนเปื้อนของเชื้อแอโรบส์ ส่วนอีก plate หนึ่งอุ่นในสภาวะไร้อ็อกซิเจน

Control strain

Mobiluncus curtisii ss.curtisii (ATCC 35241)

Mobiluncus curtisii ss.holmesii (ATCC 5242)

Comma-shaped long PK 6870

Staphylococcus aureus (ATCC 259523)

ข. ศึกษา MIC ของเชื้อ *Gardnerella vaginalis*

มีเดีย

GC base(BBL), chocolated sheep blood ร้อยละ 5, Isovitalex enrichment ร้อยละ 1

การเตรียมเชื้อ

บัคเตรีที่เพาะบน plate chocolate agar นาน 48 ชั่วโมง เขี่ยมา 1 loop ละลายใน trypticase soy broth (TSB) (BBL) ปรับความขุ่นด้วย TSB ให้เท่ากับ Mc Farland's Standard No. 1

วิธีทำ

หยดบัคเตรีบน plate ด้วย applicator บ่มเชื้อในตู้อบ 37 °ซ โดยใส่ใน candle jar นาน 48 ชั่วโมง

Control strain

Gardnerella vaginalis (Piot strain)

Staphylococcus aureus ATCC 259523

การอ่านผล

อ่านค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของยาปฏิชีวนะ ที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของบัคเตรีได้เป็นค่า MIC

8. การเก็บเชื้อ *Mobiluncus* และ *Gardnerella vaginalis*

เก็บเชื้อ *Mobiluncus* ใน skim milk double strength ใส่ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 °ซ (Baron et al.1984) ส่วนเชื้อ *Gardnerella vaginalis* เก็บเชื้อใน trypticase soy broth และ fetal bovine serum ผสมในอัตรา 1:1 ใส่ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 °ซ เช่นกัน

9. การเตรียมสารเพื่อไปฉีดเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) (Holdman et al.1977)

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการตรวจหา metabolite product ใน peptone yeast extract broth ที่มี glucose ความเข้มข้นร้อยละ 1 (PYG) เสริมด้วยซีรัมของกระต่ายร้อยละ 2 บ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 5 วัน นำ broth ดังกล่าวมาสกัดสารเพื่อไปฉีดเข้าเครื่อง GLC

9.1 วิธีสกัด volatile fatty acid (VFA) (Mayhew et al. 1975)

ดูด broth 1 มล. ใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13x100 มม. ที่สะอาด เติม H_2SO_4 ความเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 0.2 มล. และ NaCl 0.4 กรัม เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม ether(Anesthetic ether ของ M & B) 1 มล.คว่ำหงายหลอด 20 ครั้ง นำไปปั่นในเครื่องปั่น เพื่อให้ emulsion หายไป เติม anhydrous Na_2SO_4 เล็กน้อย เพื่อดูดน้ำ ตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ดูดส่วนแยกชั้น ether (ส่วนบน) ด้วยไปเปตนำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC ด้วย microsyringe

9.2 <u>วิธีสกัด non-volatile fatty acid (NVFA)</u> (Watt et al. 1982)

ดูด broth 1 มล. ใส่หลอดจุกเกลียวขนาด 13x100 มม. ที่สะอาด เติม H_2SO_4 ร้อยละ 50 จำนวน 0.4 มล. ผสมให้เข้ากัน เติม methanol 2 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60 °ซ นานประมาณ 30 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่น 1 มล. และเติม chloroform 0.5 มล. คว่ำหงายหลอด 20 ครั้ง นำไปปั่นในเครื่องปั่นเพื่อให้ emulsion หายไป ดูดแยกส่วนชั้น chloroform (ส่วนล่าง) ด้วยไปเปต ไปฉีดเข้าเครื่อง GLC ด้วย microsyringe

10. <u>เครื่องมือ (Equipments)</u>

10.1 Steers' inoculum replicating apparatus

10.2 Stereoscopic microscope รุ่น OM system B 071 (Olympus)

10.3 Gas-Liquid Chromatography รุ่น varian-3700 dual flame ionization gas chromatograph ร่วมกับ Spectra-Physics SP 4290 integrator

Gas-Liquid Chromatography (GLC) เป็น coiled stainless stell column ยาว 10 ฟุต และเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน

เท่ากับ 0.08 นิ้ว ประกอบด้วย stationary phase เป็น Chromasorb G (80/100 mesh) เป็น supporter ซึ่ง coated ด้วย liquid phase เป็น modified terephthalic acid (FFAP) ร้อยละ 5 ใช้ nitrogen เป็น carrier gas ต่อ packed column เข้ากับส่วนของ injector ส่วนอีกปลายต่อกับ detector โดยตั้งอุณหภูมิ 170 °ซ และ flow rate ของ nitrogen เท่ากับ 10 มล./นาที นาน 24 ชั่วโมง

set เครื่อง GLC แบบ Programing oven temperature สำหรับตรวจหา VFA & NVFA

Injector temp. = 210 °ซ

Detector temp. = 220 °ซ

Nitrogen flow rate ประมาณ 55.8 มล./นาที

flame ionizing gas for FID detector คือ H_2 & air

flow rate ของ H_2 = 30 มล./นาที

flow rate ของ air = 300 มล./นาที

attenuation = 4 (สำหรับ VFA) และ 8 สำหรับ (NVFA)

programing temperature โดย initial temp. = 110 °ซ นาน 2 นาที เพิ่มเป็น 145 °ซ โดยอัตราเพิ่ม 10 °ซ/นาที chart speed เท่ากับ 0.25 ซม./นาที

10.4 Light microscope (Olympus)