บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้รับความเอื้อเฟื้อจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล มีทั้งหมด 6 ชนิด ดังนี้

1.1.1 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

1.1.2 *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)

1.1.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

1.1.4 *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*)

1.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

1.1.6 *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*)

เชื้อทั้ง 6 ชนิดนี้ ได้จากผู้ป่วยที่รับไว้รักษาในโรงพยาบาลรามาธิบดี ระหว่างปี 2522-2523

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 Brain-Heart Infusion (dehydrated) (BHI) ใช้ของบริษัท Difco BHI 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (มล) นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ (lb) นาน 15 นาที pH สุดท้ายจะเป็น 7.4 0.2 ที่ 25° ซ

1.2.2 Brain Heart Infusion Agar (dehydrated) ใช้ของบริษัท Difco (BHI agar 52 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล) ต้มให้ละลายและคนให้เข้ากันด้วย magnetic stiror นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่ 121° ซ ความดัน 15 lb นาน 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-55° ซ เติมเลือดที่ปราศจากเชื้อ (human blood ได้จากคลังเลือด โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล)

ประมาณร้อยละ 5 (v/v) เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ petridish โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ประมาณ plate ละ 15-20 มล ทำให้เย็นและแข็งตัวแล้วจึงเก็บใส่ตู้เย็น เพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อต่อไป

1.2.3 10% dextrose solution ใช้ dextrose 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล แล้วนำไปกรองผ่าน millipore เพื่อกรองเอาแบคทีเรียออก ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (BHI broth) ร้อยละ 1 (v/v) เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าอาหาร ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและ subculture เชื้อ

1.2.4 Recovery broth ประกอบด้วย BHI broth และ Tween-80 ร้อยละ 3 (w/v)

Tween-80 ใช้ของบริษัท Difco 1 มล = 1 กรัม

1.3 Standard hard water (น้ำกระด้างมาตรฐาน) ใช้ส่วนประกอบตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกดังนี้

anhydrous calcium chloride ($CaCl_2$)	0.304 กรัม
magnesium chloride hexa hydrated ($MgCl_2$ $6H_2O$)	0.139 กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1000 มล

ละลายให้เข้ากัน จะได้น้ำกระด้างมาตรฐานที่มีความกระด้าง 342 Part per millian (ppm) นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่ 121° ซ ความดัน 15 lb นาน 15 นาที ใช้สำหรับเจือจาง (diluent) น้ำยาฆ่าเชื้อและใช้ในการเตรียม yeast suspension และ Inoculum

1.4 อุปกรณ์อื่น ๆ มี

1.4.1 Finn pipette ขนาด 5-50 µl ใช้เป็น 0.02 มล pipette dropper

1.4.2 Test tube ขนาด 15 x 150 มม

1.4.3 Petridish

1.4.4 Pipette ขนาด 1 มล, 5 มล, 10 มล

1.4.5 Loop and needle

1.4.6 Shaking machine

1.4.7 กระดาษกรองWhatman's เบอร์ 4

1.4.8 flask ขนาด 500 มล

1.4.9 beaker ขนาด 500 มล

1.4.10 100 mesh sieve

2. วิธีการ ใช้ตาม Kelsey-Sykes test for disinfectants (1974)[4]

2.1 การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง โดยวิธี minimum inhibitory concentration test (MIC)[4,50](ภาพที่ 1 หน้า39)

2.1.1 นำเชื้อที่ต้องการทดลองมาชนิดละ 5 พันธุ์ (strain) ยกเว้น *Pseudomonas cepacia* มีเพียง 1 พันธุ์

2.1.2 เลี้ยงเชื้อดังกล่าวใน slant BHI agar เก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ ยกเว้น Pseudomonas cepacia เก็บแบบ lyophelized

2.1.3 Subculture เชื้อแต่ละชนิดทุกวัน (ให้ได้ 5-14 ครั้ง) ใน BHI broth 6 มล ที่ผสม 10% dextrose แล้ว incubate ที่ 32 ± 1° ซ นาน 24 ชั่วโมง (ครั้งสุดท้าย subculture ใน broth 10 มล)

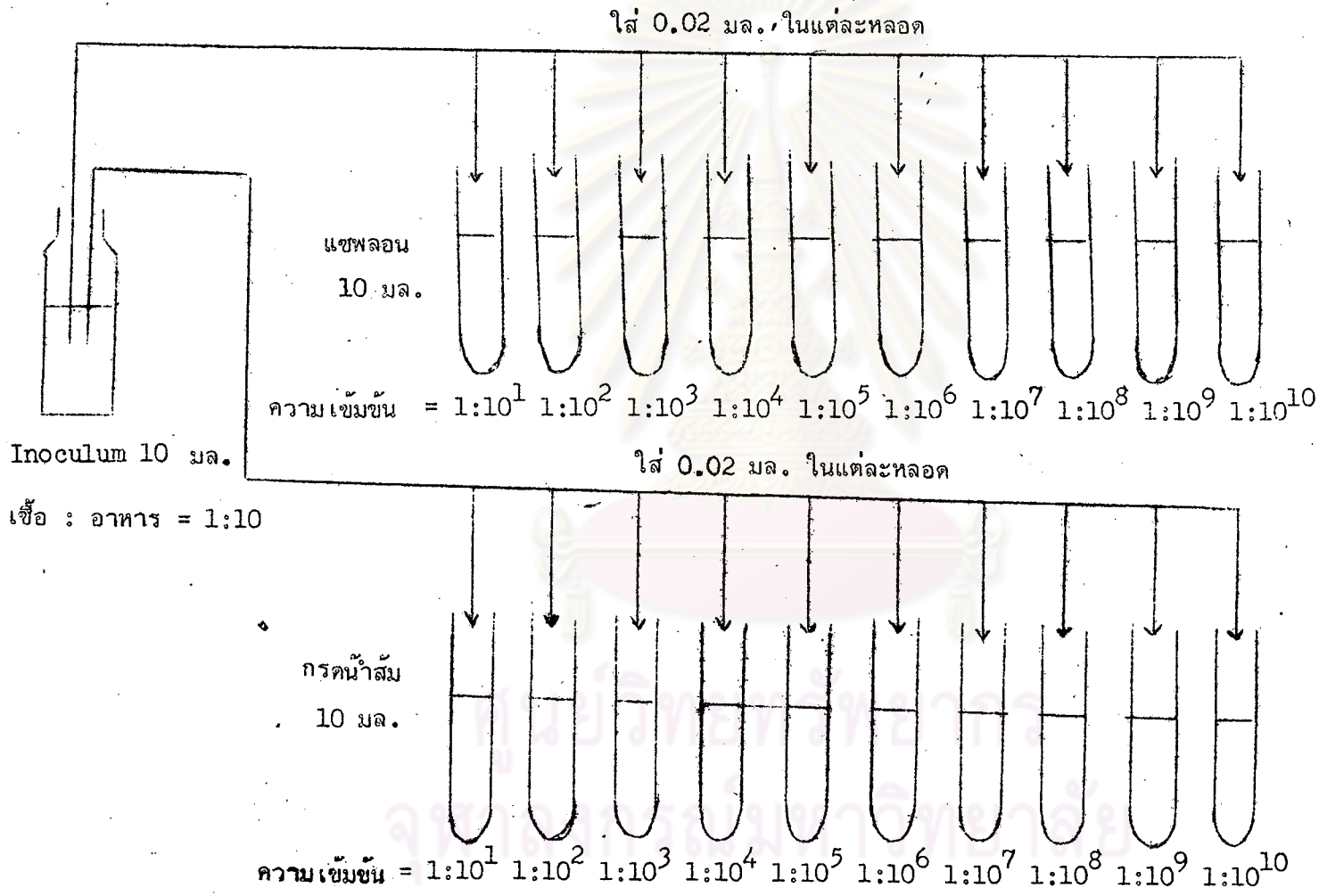
2.1.4 นำเชื้อที่ subculture ครบแล้ว มาทำให้เจือจางเป็น 1:10 ด้วย BHI broth ที่ผสม 10% dextrose แล้ว เชื้อ *Pseudomonas* ก่อนเจือจาง ต้องกรองเอาเมือกออกก่อนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

2.1.5 นำแชพลอนและกรดน้ำส้มมาทำให้เจือจางเป็น 10 doubling dilution ด้วย BHI broth

2.1.6 ใช้ finn pipette ดูดเชื้อที่เจือจาง (1:10) ไว้แล้ว มาใส่ลงในน้ำยาทั้ง 2 ชนิด dilution ละ 0.02มล (20λ) แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดนี้ incubate ที่ 32 ± 1° ซ นาน 72 ชั่วโมง

2.1.7 อ่านผลโดยเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในน้ำยาทั้ง 2 ชนิดที่มีความเข้มข้นสูงสุด มาทำการทดลองเพียง 1 พันธุ์ แต่ถ้าผลที่ได้เป็นคนละพันธุ์ ก็นำมาทดลองทั้งสองพันธุ์

ภาพที่ ๑ แสดงขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง



2.2 การนับเชื้อ ในการทดลองแต่ละครั้ง ต้องเลี้ยงเชื้อ และนับ ใช้วิธี surface drop method[5] ให้ได้ viable organism ไม่น้อยกว่า 10^8-10^{10}/มล ในการนับเชื้อให้วัดความขุ่นของเชื้อประกอบด้วยทุกครั้ง

2.2.1 ใช้ loop แยกเชื้อที่ต้องการทดลองจาก slant มา streak บน BHI blood agar plate, incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 24 ชม

2.2.2 ใช้ needle แตะเชื้อจาก plate โดยเลือกเอา pure colony มาใส่ใน BHI broth 10 มล ที่ผสม 10% dextrose แล้ว incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 18-24 ชม

2.2.3 นำหลอดที่เลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer บันทึกค่าไว้

2.2.4 นำหลอดเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็ว 2500 rpm (รอบต่อนาที) นาน 30 นาที (เชื้อ *Pseudomonas* ก่อนนำไปปั่นต้องกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ก่อน) ใช้ pipette ดูดน้ำส่วนบนออกแล้วเติมน้ำกระด้างมาตรฐานที่ปราศจากเชื้อ (sterile standard hard water) เพื่อละลายใหม่อีก 10 มล เขย่าให้เข้ากันด้วย shaking machine

2.2.5 ทำเชื้อให้เจือจางเป็น 1:1000 โดยใช้ finn pipette ดูดเชื้อจากข้อ 2.2.4 มา 0.01 มล ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกระด้างมาตรฐาน ปราศจากเชื้อ 10 มล เขย่าให้เข้ากันด้วย shaking machine

2.2.6 ทำเชื้อให้เจือจางเป็น 1:10,000 โดยดูดเชื้อจากข้อ 2.2.5 มา 0.1 มล ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกระด้างมาตรฐานปราศจากเชื้อ 0.9 มล เขย่าให้เข้ากันด้วย shaking machine

2.2.7 ใช้ finn pipette ดูดเชื้อจากข้อ 2.2.6 มา 0.01 มล หยดลงบน BHI blood agar plate ใช้ loop streak ให้ทั่ว plate incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 24 ชม

2.2.8 นำ plate ออกมานับเชื้อ แล้วคำนวณจากค่าความเจือจางทั้งหมดก็จะทราบจำนวนเชื้อที่มีทั้งหมดในข้อ 2.2.4 ซึ่งเป็นจำนวนเชื้อที่จะนำไปทดลอง

การนับเชื้อโดยวิธีนี้ จะทราบผลภายใน 24 ชม ฉะนั้นการนับเชื้อแต่ละครั้ง จึงต้องวัดความขุ่นด้วยทุกครั้ง เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบอย่างคร่าว ๆ ก่อนที่จะเริ่มทำการทดลอง โดยค่าความขุ่นก่อนทดลองจะต้องใกล้เคียงกับค่าความขุ่นที่วัดได้เมื่อมีจำนวนเชื้อเท่าที่ต้องการ

จากวิธีการนี้ ได้ค่าความขุ่นกับจำนวนเชื้อต่าง ๆ ที่นำมาทดลองดังนี้ (วัดความขุ่นโดยใช้ wave length 540 nm)

Staphylococcus aureus $2x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.7 (OD)

Klebsiella pneumoniae $6x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.6 (OD)

Escherichia coli $1.2x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.4 (OD)

Proteus vulgaris $1.2x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.55 (OD)

Pseudomonas aeruginosa $2x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.25 (OD)

Pseudomonas cepacia $3.5x10^8$ col/ml, ความขุ่น 0.65 (OD)

2.3 การเตรียม Inoculum (Kelsey-Sykes, 1974)

2.3.1 สภาพสะอาด (clean condition) หมายถึงสภาวะที่เชื้อไม่ได้ปะปนกับหนอง เลือด อุจจาระ หรือสิ่งอื่น ๆ

2.3.1.1 นำเชื้อที่จะทดลองมา subculture ทุกวันใน BHI broth 6 มล (ผสม 10% dextrose แล้ว) ให้ได้ 5-14 ครั้ง incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 24 ชั่วโมง การ subculture ครั้งสุดท้าย ให้ใช้ BHI broth 10 มล

2.3.1.2 นำหลอดเลี้ยงเชื้อที่ได้มาวัดความขุ่น บันทึกค่าไว้ (ควรจะได้ค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองในข้อ 2.2 จึงจะมีจำนวนเชื้อเท่าที่ต้องการ) แล้วนำไปปั่นที่ 2500 rpm นาน 30 นาที (*Pseudomonas* ก่อนปั่นต้องกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4) ใช้ pipette ดูดน้ำส่วนบนออก แล้วละลายใหม่ด้วยน้ำกระด้างมาตรฐานปราศจากเชื้อ 10 มล เขย่าให้เข้ากันด้วย shaking machine ก็จะได้ inoculum สำหรับสภาพสะอาด

2.3.1.3 ต้องเอาเชื้อจากหลอดนี้ไปนับเชื้อตามวิธีในข้อ 2.2 ซึ่งควรได้ไม่ต่ำกว่า 10^8-10^{10} /มล

2.3.2 สภาพสกปรก (dirty condition) หมายถึงสภาวะที่เชื้อปะปนกับหนอง เลือด อุจจาระ หรือสารอินทรีย์อื่น ๆ

วิธีการเตรียม inoculum เหมือนข้อ 2.3.1 แต่ต้องเติมสารละลายยีสต์ 5% ลงไปให้ได้ความเข้มข้นขั้นสุดท้าย ใน inoculum เป็น 2% โดยผสมสารละลายยีสต์ 5% จำนวน 4 มล ลงใน inoculum 6 มล เขย่าให้เข้ากันด้วย shaking machine จะได้ inoculum สำหรับสภาพสกปรก

2.3.2.1 การเตรียมสารละลายยีสต์[45] ใช้ baker yeast

2.3.2.1.1 ชั่งยีสต์มาครั้งละ 20 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 500 มล เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย บดให้เข้ากันจนเป็นเหมือนครีม

2.3.2.1.2 เติมน้ำกลั่นให้ได้เป็น 50 มล จะได้สารละลายยีสต์ 40% กรองด้วย 100 mesh sieve ใส่ใน beaker อันใหม่

2.3.2.1.3 เติมน้ำกลั่น ให้ได้เป็น 100 มล จะได้สารละลายยีสต์ 20% เทใส่ flask ขนาด 500 มล นำไป autoclave ที่ 121° ซ ความดัน 15 lb นาน 15 นาที

2.3.2.1.4 ใช้ pipette ดูดสารละลายยีสต์ 20% มาครั้งละ 25 มล ใส่ใน petridish ที่บันทึกน้ำหนักไว้แล้ว นำไปทำให้แห้งในตู้อบ (hot air oven) 100° ซ

2.3.2.1.5 นำออกมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จะทราบ dry weight ของยีสต์

2.3.2.1.6 เติมน้ำกระด้างมาตรฐานปราศจากเชื้อให้ได้เป็น 5% dry weight yeast suspension โดยคำนวณจากน้ำหนักยีสต์ในข้อ 2.3.2.1.5 และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.9-7.1 โดยใช้ pH meter

√ 2.4 การเตรียม Disinfectant dilutionsการเตรียมนี้ต้องทำในวันที่จะทำการทดลอง ไม่ควรเจือจางไว้นาน เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อเปลี่ยนไป ใช้น้ำกระด้างมาตรฐานเป็นตัวเจือจาง

น้ำยาฆ่าเชื้อที่นำมาทดลองมี 2 ชนิด

- Savlon (1.5% Chlorhexidine + 15% cetrimide) ของบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI)

- Glacial acetic acid ของบริษัทศรีจันทร์-สหโอสถ

2.4.1 เตรียมแซพลอน และกรดน้ำส้มให้เจือจาง ตามความเข้มข้นที่ต้องการทดลองดังนี้

แซพลอน	1:100	1:60	1:30	1:10
กรดน้ำส้ม	1:100	1:50	1:25	1:12.5

2.4.2 นำน้ำยาทั้งสองชนิดแต่ละความเข้มข้น มาเจือจางต่อดังนี้

A. มีความเข้มข้นน้อยกว่า B 50%

B. ความเข้มข้นที่ต้องการทดลอง

C. มีความเข้มข้นมากกว่า B 50%

ฉะนั้นความเข้มข้นที่จะต้องทำการทดลองมี

แซพลอน	1:200	1:100	1:66	(3:200)
	1:120	1:60	1:40	
	1:60	1:30	1:20	
	1:20	1:10	1:6	(3:20)
กรดน้ำส้ม	1:200	1:100	1:66	(3:200)
	1:100	1:50	1:33	(3:100)
	1:50	1:25	1:16	(3:50)
	1:25	1:12.5	1:8	(3:25)

2.5 การทดลองหาความเข้มข้นของแซพลอนและกรดน้ำส้มที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อ ทดลองทั้งในสภาพสะอาด และสกปรกด้วยวิธีการเหมือนกันดังนี้

2.5.1 เตรียม inoculum ทั้งสภาพสะอาดและสภาพสกปรก ตามวิธีข้อ 2.3

2.5.2 เตรียมน้ำยาแซพลอนและกรดน้ำส้มให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการจะทดลองตามข้อ 2.4

2.5.3 ในแต่ละความเข้มข้นที่ทดลอง ดูดน้ำยาที่เจือจางเป็น A B C มาอย่างละ 3 มล ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อและเขียนพยัญชนะกำกับไว้ข้างหลอด (A, B, C)

2.5.4 เตรียม recovery broth ใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อหลอดละ 10 มล โดยเตรียมทั้งหมด 45 หลอด

A1	A2	A3	อย่างละ	5	หลอด
B1	B2	B3	"	5	"
C1	C2	C3	"	5	"

2.5.5 เริ่มการทดลอง ดูตาราง 2 หน้า 47 และภาพที่ 2 หน้า 48 ประกอบ

2.5.5.1 ในช่วงเวลาแรก (0,1 และ 5 นาที) ใช้ pipette ดูด inoculum (สภาพสะอาดหรือสกปรก) ใส่ในหลอดน้ำยาฆ่าเชื้อ A,B,C ตามลำดับ หลอดละ 1 มล เขย่าด้วย shaking machine

2.5.5.2 8 นาทีต่อมา (นาทีที่ 8,9 และ 13) ใช้ finn pipette ดูดส่วนผสมของเชื้อและน้ำยา (inoculum/disinfectant mixture จากหลอด A,B,C มาหลอดละ 0.02 มล ใส่ใน recovery broth A1 B1 และ C1 ตามลำดับ ให้ครบ 15 หลอด

2.5.5.3 10 นาทีหลังจากการเติมเชื้อครั้งแรก (นาทีที่ 10, 11 และ 15) ใช้ pipette ดูด inoculum เติมในน้ำยา A,B,C อีกหลอดละ 1 มล

2.5.5.4 8 นาทีต่อมา (นาทีที่ 18,19 และ 23) ใช้ finn pipette ดูดส่วนผสมจาก A,B,C มาหลอดละ 0.02 มล ใส่ใน recovery broth A2 B2 และ C2 ตามลำดับ จนครบ 15 หลอด

2.5.5.5 10 นาทีหลังจากการเติมเชื้อครั้งที่สอง (นาทีที่ 20, 21 และ 25) ใช้ pipette ดูด inoculum เติมในน้ำยา A,B,C อีกหลอดละ 1 มล

2.5.5.6 8 นาทีต่อมา (นาทีที่ 28,29 และ 33) ใช้ finn pipette ดูดส่วนผสมจาก A,B,C มาหลอดละ 0.02 มล ใส่ใน recovery broth A3 B3 และ C3 ตามลำดับจนครบ 15 หลอด

2.5.5.7 นำ recovery broth ทั้งหมด incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 48 ชั่วโมง

2.5.5.8 อ่านผลการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำยาที่จะผ่านการทดลองได้จะต้องไม่มีการเจริญของเชื้ออย่างน้อย 2 ใน 5 หลอด จากการเติมเชื้อแต่ละครั้ง และต้องได้ผลดังกล่าวนี้ไม่ต่ำกว่า 2 ครั้งจากการเติมเชื้อ 3 ครั้ง

2.6 การทดลองหาเวลาที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้หมดของแซพลอนและกรดน้ำส้ม ทำการทดลองทั้งสภาพสะอาดและสกปรก

2.6.1 เตรียม inoculum ทั้งสภาพสะอาด และสภาพสกปรก ตามวิธีข้อ 2.3

2.6.2 เตรียมแซพลอนและกรดน้ำส้มให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จะทดลอง (โดยเลือกจากความเข้มข้นที่ผ่านการทดลองในข้อ 2.5)

2.6.3 เตรียม recovery broth ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มล

2.6.4 เตรียม BHI blood agar plate

2.6.5 ใช้ pipette ดูด inoculum (สภาพสะอาดหรือสกปรก) ใส่ในน้ำยาฆ่าเชื้อที่ต้องการทดลอง 1 มล เขย่าด้วย shaking machine

2.6.6 ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที, 60 นาที และ 24 ชม จึงใช้ finn pipette ดูดส่วนผสมของน้ำยาและเชื้อ มาใส่ใน recovery broth ตามระยะเวลา ครั้งละ 0.02 มล และอีก 0.02 มล หยดลงบน blood agar plate ใช้ loop streak ให้ทั่ว นำไป incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 24 ชั่วโมง

2.6.7 ควบคุมการทดลองโดย ใส่เชื้อที่ไม่ได้ผ่านน้ำยาฆ่าเชื้อใน recovery broth และ blood agar plate ตามเวลา 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที, 60 นาที และ 24 ชม เช่นกัน นำไป incubate ที่ $32^{\circ}\pm1^{\circ}$ ซ นาน 24 ชั่วโมง

2.6.8 อ่านผลการทดลอง โดยดูการเจริญของเชื้อจากหลอดทดลอง และนับเชื้อบน blood agar plate ในแต่ละระยะเวลาว่าลดลงเท่าใด และไม่เจริญเลยในระยะเวลาเท่าใด ส่วนหลอดและ plate ที่ควบคุมจำนวนเชื้อไม่ควรจะลดลงเลย จึงจะแสดงว่าเชื้อไม่ได้ตายเอง แต่ตายเพราะประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของน้ำยาฆ่าเชื้อ

กำหนดระดับการเจริญของเชื้อดังนี้

1^+	มีเชื้อเจริญได้จำนวน	1-200 col
2^+	"	201-400 col
3^+	"	401-600 col
4^+	"	600 col ขึ้นไปจนไม่สามารถนับได้

ทำการทดลองตามวิธีดังกล่าวทั้งหมดนี้กับเชื้อทั้ง 6 ชนิด และเชื้อแต่ละชนิดจะต้องผ่านการทดลองกับน้ำยาแซพลอนและกรดน้ำส้ม ทุก ๆ ความเข้มข้นที่ต้องการทดลอง เพื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของน้ำยาแต่ละชนิดต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

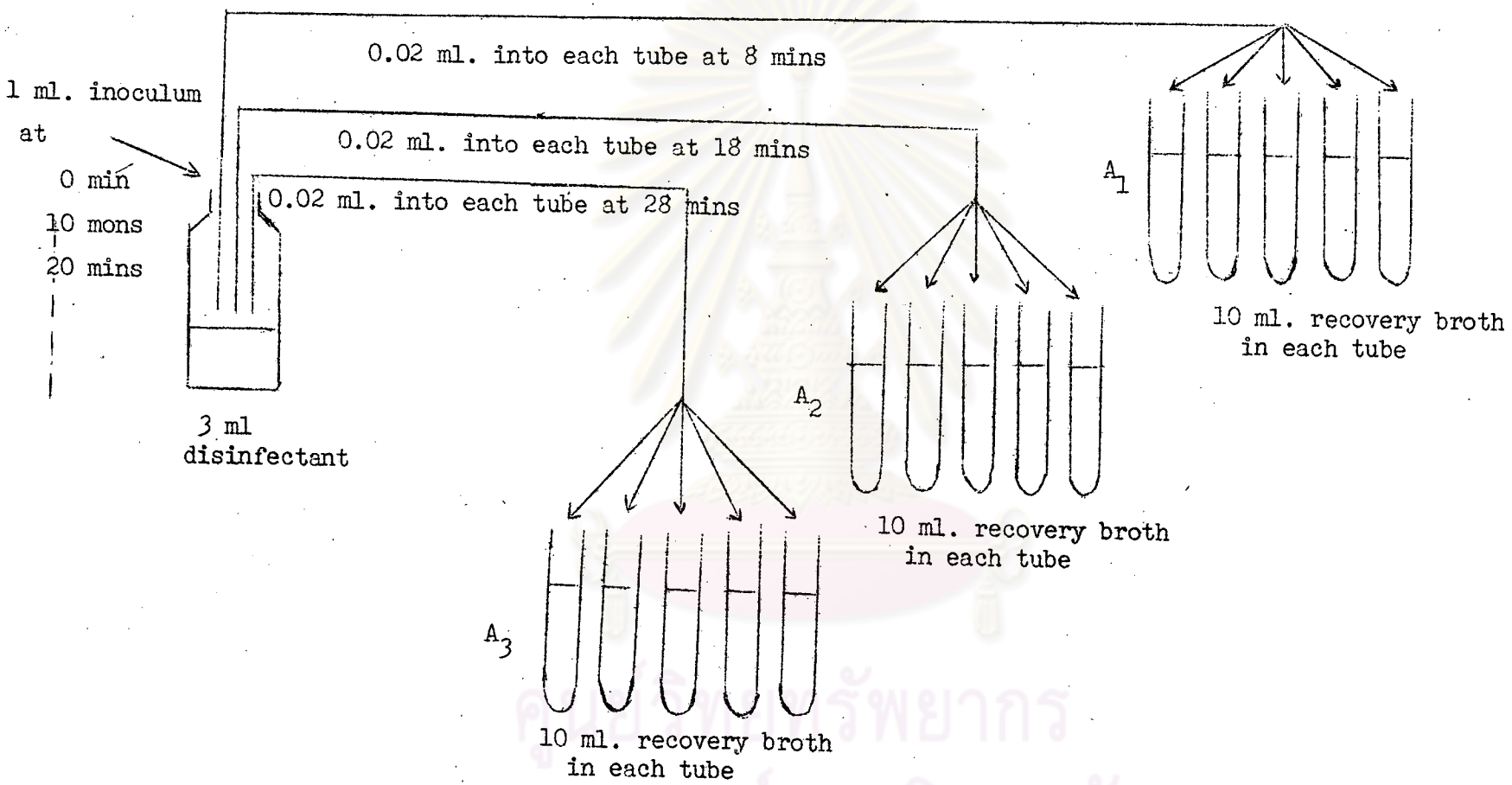
ตารางที่ ๒ Kelsey-Sykes test timetable (1974)

Disinfectant Concentration A		Disinfectant Concentration B		Disinfectant Concentration C	
Time (min)	Action	Time (min)	Action	Time (min)	Action
0	1 ml. inoculum to A	1	1 ml. inoculum to B	5	1 ml. inoculum to C
8	sample drops to recovery broth A1 (0.02 ml)	9	sample drops to recovery broth B1 (0.02 ml)	13	sample drops to recovery broth C1 (0.02 ml)
10	1 ml. inoculum to A	11	1 ml. inoculum to B	15	1 ml. inoculum to C
18	sample drops to recovery broth A2	19	sample drops to recovery broth B2	23	sample drops to recovery broth C2
20	1 ml. inoculum to A	21	1 ml inoculum to B	25	1 ml. inoculum to C
28	sample drops to recovery broth A3	29	sample drops to recovery broth B3	33	sample drops to recovery broth C3

Kelsey, J.C., MD, and Isobel M, Maurer, BSc., Kelsey-Sykes test for disinfectants, The Pharmaceutical Journal. Nov. 30, 1974. (p. 529)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ๖ แสดงวิธีการทดลองตาม Kelsey-Sykes technique สำหรับน้ำยาฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้นหนึ่ง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย