# บทที่ 2

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### อุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ได้แก่

- สวอบ ที่ทำด้วยสำลี (Cotton Swab)
- หลอดทดลอง (Test Tube)
- จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)
- ลวดถ่ายเชื้อ (Loop)
- ไปเป็ต (Pipette)
- หม้ออัดโตเคลฟ (Antoclave)
- เครื่องปั่นแยก (Centrifuge)
- ตะเกียงบุนเซ่น (Bunsen Burner)
- ตู้อบสำหรับเพาะเชื้อ (Incubator)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ(Media) ได้แก่

- Blood Agar ประกอบด้วย Bacto-agar ผสมเลือดม้าเทลงใน Petri Dish ให้แผ่ทั่วจาน หนาประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร ขณะยังร้อน เมื่อเย็นจะเป็นแผ่นวุ้นคอนข้างแข็งอยู่ตัว

- Todd-Hewitt Broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็นของเหลว บรรจุในหลอดทดลองหลอดละประมาณ 8 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ปิดจุกด้วยสำลี

Reagents ที่ใช้ได้แก่

- น้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

- Antiserum สำหรับหากรุ๊ปของสเตรปโตคอคคัส ผลิตโดยบริษัท Difco, Detroit, Michigan, U.S.A.เป็น Lyophilized Form บรรจุอยู่ในขวด เวลาใช้ต้องเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ลงไป 1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร เขย่าให้ละลาย มีทั้งหมด 13 กรุ๊ปคือจากกรุ๊ป A ถึง O (ไม่มีกรุ๊ป I และ J )

- Bacitracin Dise สำหรับใช้ Idenfity สเตรปโตคอคคัสกรุ๊ป A ผลิตโดยบริษัท Mast Laboratories Ltd. Liverpool, England ความเข้มข้นของ Bacitracin o.1 unit per dise.

แหล่งที่มาของเชื้อสเตรปโตคอคคัส ได้แก่

- คนไข้ที่เป็นโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วิธีทำการวิจัย

ทำตามลำดับขั้นดังนี้

1. ทำการศึกษาคนไข้ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่มีอาการโรคที่แสดงว่าเกิดจากการติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส เช่น เป็นโรคต่อไปนี้

- โรคคอเจ็บ (Septic Sorethroat)
- ช่องคออักเสบ (Pharyngitis)
- ต่อมทอนซิลอักเสบ (Tonsillitis)
- โรคไฟลามทุ่ง (Erysipelas)
- ข้ออักเสบ (Arthritis)
- ไซนัสอักเสบ (Sinusitis)
- ไข้ดำแดง (Scarlet Fever)
- มาสตอยด์อักเสบ(Mastoiditis)
- หลอดลมอักเสบ(Bronchitis)

- ปอดอักเสบ (Pneumonitis)
- Herpes Simplex Stomatitis ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อน
- อะคิ้วโกลเมอรูโลเนฟไฟรติส (Acute Glomerulonephritis)
- รูมาติคฟีเวอร์ (Rheumatic Fever)
- สันนิบาตหน้าไฟ (Pnerperal Sepsis)
- การแท้งบุตรติดเชื้อ (Septic Abortion)
- หูน้ำหนวก (Otitis Media)
- เซลลูไลติส (Cellulitis)
- บาดทะยัก (Tetanus)
- เหงือกอักเสบ (Gingivitis)
- ไดอะเบติคแกงกรีน (Diabetic Gangrene)
- ฝี (Abscess)
- แผลถูกของร้อนลวก, ไฟไหม้ (Burn)ที่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน
- เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis)
- ท่อปัสสาวะอักเสบ (Urinary Tract Infection)
- ไส้ติ่งอักเสบ (Appendicitis)
- แผลพุพอง (Impetigo)
- ผิวหนังอักเสบเป็นหนอง (Pyoderma)
- แผลผ่าตัดอักเสบ (Infected Operation Wound)

2. ศึกษาถึงข้อพิสูจน์ว่าคนไข้เป็นโรคติดเชื้อสเตรปโตคอคคัส โดยรวบรวมเรื่องราวและผลตรวจทางคลีนิค (Clinical Diagnosis) เช่น

- มีแผล (Lesion)
- มีไข้ (Fever)
- มีเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นมากกว่าระดับปกติ
- มี ASO titer สูงขึ้นมากพอ
- และอาการอื่น ๆ

3. ทำการแยกเชื้อจากคนไข้ (Pure Culture Study)

โดยใช้ Swab มาป้ายเชื้อจากแผลของคนไข้ แล้วเพาะเชื้อ (Culture) ลงใน Blood Agar Plate นำไปอบใน Incubatorที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจดูว่ามี Beta-Hemolytic Streptococcus หรือไม่ โดยดูว่ามีบริเวณที่แล เห็นใส ๆ ซึ่งเม็ดเลือดแดงถูกทำลายไปหมด (Complete Hemolysis) อยู่รอบ ๆ โคโลนี ของแบคทีเรีย นำไปย้อม Gram Stain ดู จะเห็นว่าเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม (Cocci)ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว ลักษณะโคโลนี่ค่อนข้างเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 1 มิลลิเมตร รูปร่างกลม นูน เรียบ ผิวเป็นเมือก หรือด้าน[3] ถ้ามี Beta-Hemolytic Streptococci ก็นำมา Isolateทำ Pure Culture ลงใน Blood Agar Plate นำไปวางไว้ใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหา Serogroup

4. วิธีหา Serogroup ใช้ 2 วิธีต่อไปนี้

- วิธี Bacitracin Disc Technique

เป็นวิธีหากรุ๊ปของสเตรปโตคอคคัสว่าเป็นกรุ๊ป A หรือไม่ใช่กรุ๊ป A (Not Group A)

วิธีทำ นำเข็มยาว ๆ หรือ loop มาเผาไฟที่ปลายให้ร้อนเพื่อฆ่าเชื้ออื่น ๆ เมื่อปล่อยให้เย็นแล้ว ใช้ปลายแตะที่โคโลนีเดียวของ Beta-Hemolytic Streptococcus บน Blood Agar ละเลงเบา ๆ บนผิวของ Blood Agarในอีก Plate หนึ่ง Inoculate ไว้หนา ๆ นำปากคีบมาเผาไฟที่ปลาย ปล่อยให้เย็นแล้วเปิดจุกขวดที่ใส่ Bacitracin Disc คีบขึ้นมา 1 แผ่น วางลงตรงกลางของบริเวณที่ Inoculateเชื้อไว้ ปิดจุกขวดให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นปิดฝา Blood Agar Plate นำไปวางคว่ำในตู้ Incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำออกมาดู ถ้าเป็นสเตรปโตคอคคัสกรุ๊ป A จะถูกห้ามการเจริญเติบโตโดย Bacitracin ทำให้เห็นเป็นบริเวณที่ปราศจากเชื้ออยู่รอบ ๆ Bacitracin Disc จะเห็นสีแดงของเม็ดเลือดที่ไม่มีHemolysis บริเวณนี้เรียกว่า Zone of Inhibition ส่วนบริเวณถัดออกมาจะมีเชื้อ Beta-Hemolytic

Streptococci ขึ้นอยู่ ซึ่งจะทำให้เกิด Complete Hemolysis เห็นเป็นบริเวณของวุ้นที่ใสเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย

ถ้าเป็นสเตรปโตคอคคัสกรุ๊ปอื่นจะไม่เกิด Zone of Inhibition เชื้อขึ้นได้เต็มที่

- วิธี Precipitin Test Method เป็นวิธีหา Serogroup ต่าง ๆ ตั้งแต่กรุ๊ป A ถึงกรุ๊ป O โดยใช้หลักการของปฏิกิริยาระหว่าง Antigen กับ Antibody เกิดเป็นตะกอนขุ่นขาว (Precipitate)ขึ้นระหว่างรอยต่อของ Antigen กับ Antibody Antigen ในที่นี้คือ C Carbohydrateซึ่งอยู่ใน cell wall ของสเตรปโตคอคคัส ปัจจุบันนี้ Lancefield ได้ทำการหากรุ๊ปต่าง ๆ ของ Antigen ชนิดนี้ได้ถึง 17 กรุ๊ปแล้วคือจากกรุ๊ป A ถึงกรุ๊ป S(9) (ไม่มีกรุ๊ป I และ J)

วิธีสกัด C Carbohydrate Antigen มีหลายวิธี แต่ที่เลือกใช้ในการวิจัยนี้เป็นวิธีของ Rantz และ Randall(10)

วิธีทำ เพาะเชื้อสเตรปโตคอคคัสใน Todd-Hewitt Broth ที่มีซีรั่มผสมอยู่เล็กน้อย จำนวน 40 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร นำไปอบใน Incubator ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง นำมาเทรวมกันในหลอดทดลองขนาดใหญ่แล้วนำไปปั่นแยกในเครื่อง Centrifuge โดยใช้ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วค่อย ๆ รินส่วนที่เป็นน้ำข้างบนทิ้งลงในยาฆ่าเชื้อ Lysol ที่ผสมน้ำในอัตรา 1 ต่อ 1,000 ส่วน เหลือส่วนที่เป็นตะกอนของเซลแบคทีเรียไว้ในหลอด ใช้ Pipette ขนาดบรรจุ 1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตรที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ดูดน้ำเกลือ Sodium Chloride ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ใส่ลงในหลอดที่มีเซลของสเตรปโตคอคคัสอยู่

เขย่าให้ตะกอนขุ่นขึ้นมา แล้วนำไปนึ่งภายใต้ความดันสูงในหม้อ Antoclave เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น เทเชื้อถ่ายใส่หลอดขนาดเล็กที่จุประมาณ 5 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร นำไปปั่นแยกในเครื่อง Centrifuge ใช้ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเซลตกตะกอนแล้วค่อย ๆ รินเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส ๆ ใส่ไว้ในหลอดทดลองอีก

หลอดหนึ่งที่มีขนาดเล็กเท่ากัน ส่วนนี้คือส่วนที่สกัดเอา C Carbohydrate Antigen ออกมา

วิธีทำ Precipitin Test นำหลอดแก้ว Capillary มาบรรจุ Antiserum กรุ๊ปต่าง ๆ ทีละกรุ๊ป โดยจุ่มปลายหลอดลงในขวดที่ใส่ Antiserum ให้ Antiserum ขึ้นมาในหลอด สูงประมาณ 1 เซ็นติเมตร ใช้ปลายนิ้วชี้ปิดปากหลอดยกขึ้นจากขวดปิดฝาขวดให้สนิท ใช้กระดาษนุ่ม ๆ เช็ดภายนอกหลอดให้สะอาด แล้วนำไปจุ่มลงในหลอดทดลองที่ใส่ C Carbohydrate Antigen ปิดปลายนิ้วชี้ที่ปิดปากหลอดให้ Antigen ไหลขึ้นมาในหลอด Capillary สูงประมาณ 1 เซ็นติเมตร แล้วปิดปลายนิ้วชี้ลงที่ปากหลอดอีก ยกหลอด Capillary ที่มี Antigen กับ Antiserum นี้มาปักไว้บนแท่งดินน้ำมัน ปักให้ตรงกับตัวอักษรที่แสดงกรุ๊ปไว้ตามลำดับ ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนครบหมดทุกกรุ๊ปของ Antiserum คือ A ถึง O (ไม่มี I,J) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 - 15 นาที ถ้าสเตรปโตคอคคัสที่นำมาศึกษา เป็นกรุ๊ปเดียวกับ Antiserum ในหลอดไหนก็จะเกิดตะกอนขุ่นขาว (Precipitate) ขึ้นตรงรอยต่อของ Antigen และ Antiserum ในหลอดนั้น

ในการวิจัยนี้ ทำการแยกเชื้อ Beta-Hemolytic Streptococcus หา Serogroup ว่าเป็นกรุ๊ป A หรือมิใช่กรุ๊ป A โดยวิธี Bacitracin Disc ก่อน เมื่อรู้ผลแล้ว จึงนำเชื้อนี้ไปหา Serogroup โดยวิธี Precipitin Test ต่อไป

001533