บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo disecting
4. ชุดกรองปลอดเชื้อ
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
6. ชุดทดสอบปริมาณคลอรีน (DPD colorimetric kit)
7. เทอร์โมมิเตอร์

3.2 วัสดุและสารเคมี

1. เยื่อกรองชนิดเซลลูโลสไนเตรท pore size 0.2 ไมโครเมตร
2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE), BCYE ที่ใส่ glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximide (GVPC), Plate count agar (PCA), MacConkey agar และ Baird-parker agar
3. สารละลาย HCl-KCl (acid wash solution)
4. โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)
5. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)
6. สารละลาย 1% sodium hippurate
7. สารละลาย 3.5% ninhydrin
8. ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (sterile swab)

3.3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากท่อสำหรับน้ำบ้วนปาก และ triple syringe แต่ละตัวอย่างเก็บปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ (sterile) นำตัวอย่างน้ำส่งห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุดหลังจากเก็บตัวอย่าง (ภายใน 24 ชั่วโมง) โดยขณะนำส่งเก็บน้ำตัวอย่างในกล่อง หรือภาชนะที่กันความร้อนจัด หรือเย็นจัด และเก็บตัวอย่างที่ อุณหภูมิระหว่าง 6-18 องศาเซลเซียส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.4 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำ

ตรวจหาคุณภาพทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำที่นำมาศึกษา โดยวัดอุณหภูมิของน้ำ ณ สถานที่เก็บตัวอย่างด้วยเทอร์โมมิเตอร์ วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) และวัดปริมาณคลอรีนอิสระด้วยชุดทดสอบปริมาณคลอรีน[*N,N*-diethyl-*p*-phenylene-diamine (DPD) coloimetric kit]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 7 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 190917
เลขเรียกหนังสือ

3.5 การเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำ (Concentration)

นำตัวอย่างน้ำทั้งหมดไปเพิ่มความเข้มข้น โดยกรองผ่านเยื่อกรองไนโตรเซลลูโลสขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำเยื่อกรองมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ลงในหลอดที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมด้วย vortex mixer (Bartie *et al.*, 2003).

3.6 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างน้ำ

โดยวิธีการตามมาตรฐานการวิเคราะห์น้ำของ American public health association. (1992)

3.6.1 การตรวจหาแบคทีเรีย Legionella spp.

1. การเตรียมตัวอย่างก่อนเพาะเชื้อ (Pre-treatment) เพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น เติม acid wash solution (HCl-KCl solution pH 2.2) ในตัวอย่างน้ำจากข้อ 3.5 ใช้อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที นำมาปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วย 1.0 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง (pH 7)

2. การเพาะเชื้อ *Legionella* spp.

- นำตัวอย่างจากข้อข้างต้น ไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) ที่ใส่ glycine และ BCYE ที่ใส่ glycine, Vancomycin, Polymyxin B, Cycloheximide (GVPC) ด้วยวิธี spread plate ที่ 2 ระดับความเจือจาง คือ undilute และ 10^{-1} ความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องที่มีความชื้น (humid chamber) เป็นเวลา 14 วัน

- เมื่อบ่มเชื้อวันที่ 3 หรือ 4 เริ่มตรวจผลโดยการดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร BCYE และ GVPC โคโลนีของ *Legionella* spp. มีสีเทาอมฟ้า เมื่อศึกษาภายใต้กล้อง stereo dissecting microscope พบลักษณะขรุขระ (ground-glass appearance) ที่ผิวโคโลนี

- เลือกโคโลนีที่สงสัยมาเพาะแยกเชื้อด้วยการขีดแยกเชื้อ (steak plate) บน BCYE และ BCYE ที่ไม่มี L-cysteine เพื่อศึกษาความต้องการ cysteine ซึ่งเชื้อ *Legionella* spp. จะเจริญบน BCYE แต่ไม่เจริญบน BCYE ที่ไม่มี L-cysteine

- จากนั้นวินิจฉัยแยกสายพันธุ์ (species) โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี คือ ศึกษาความสามารถในการย่อย hippurate ซึ่งเชื้อ *L. pneumophila* เท่านั้นที่สามารถย่อย hippurate ได้

3.6.2 การตรวจหาแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

1. การตรวจ Viable bacterial count โดยการนำตัวอย่างน้ำจากข้อ 3.5 มาทำการเจือจาง (serial dilution) จากนั้นนำไปเพาะเชื้อบนอาหาร PCA ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีและคำนวณกลับจากปริมาณตัวอย่างน้ำที่นำไปกรอง(ml) ตามข้อ3.5 เพื่อรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml)

2. การตรวจหาแบคทีเรียแกรมลบ (Gram – negative bacteria) โดยการนำตัวอย่างน้ำจากข้อ 3.5 ไปเพาะเชื้อบนอาหาร MacConkey agar ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีลักษณะต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียแกรมลบที่พบ

3. การตรวจหาแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. โดยการนำตัวอย่างน้ำจากข้อ 3.5 ไปเพาะเชื้อบนอาหาร Baird-parker agar ด้วยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *Staphylococcus* spp. คือโคโลนีกลม ขอบเรียบ มีสีเทาถึงดำ ทั้งนี้ *S. aureus* จะสามารถย่อยสลายโปรตีนจากไข่แดงในอาหารได้ เกิดลักษณะเป็นวงใสที่อาหารเลี้ยงเชื้อ นำโคโลนีลักษณะดังกล่าว ไปศึกษาสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อระบุชนิดต่อไป

4. การตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) โดยนำตัวอย่างน้ำจากข้อ 3.5 ไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำเยื่อกรองดังกล่าวไปเพาะเชื้อบนอาหาร M-Endo บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของโคลิฟอร์ม คือ โคโลนีที่มีสีชมพูถึงแดง และมีลักษณะเหลือบแสงเงาโลหะ (metallic sheen) รายงานผลที่พบเป็นโคโลนีต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่างน้ำ สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{จำนวนโคโลนีของโคลิฟอร์ม/100มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีของโคลิฟอร์ม} \times 100}{\text{ปริมาณตัวอย่างน้ำที่นำไปกรอง(ml)}}$$

เมื่อเก็บตัวอย่างจากระบบน้ำของเครื่องมือทันตกรรมครั้งแรกแล้ว รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ให้หัวหน้าหน่วยทันตกรรมผู้ดูแลระบบทราบ และทำการแก้ไขกำจัดเชื้อโดยวิธีของรัชนี อัมพรอร่ามเวทย์และคณะ(2552) โดยทำการล้างท่อน้ำด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 0.005% ร่วมกับการเติมคลอร์เฮ็กซิดีนกลูโคเนทหรือไอซีเอกซ์ ลงในระบบน้ำของเครื่องมือทันตกรรมอย่างต่อเนื่อง หลังจากหน่วยทันตกรรมได้ดำเนินการลดการปนเปื้อนด้วยวิธีดังกล่าวไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์แล้ว จึงทำการตรวจวิเคราะห์ระบบน้ำของเครื่องมือทันตกรรมซ้ำตามข้อ 3.3-3.6 อีกครั้ง เป็นการติดตามผลหลังการทำความสะอาด