

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

แบบสำรวจความรู้ ทักษะและการปฏิบัติ

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1. ชื่อร้านอาหาร.....ชื่อเจ้าของร้านอาหาร.....
2. ประเภทของร้านจำหน่ายอาหาร.....
3. เปิดดำเนินการจำหน่ายอาหารตั้งแต่ พ.ศ.25..... รวมเวลาถึงปัจจุบัน.....ปี
4. จำนวนผู้สัมผัสอาหารทั้งหมด.....คน โดยมีผู้ปรุง.....คน คนเสิร์ฟ.....คน
5. เพศ () ชาย () หญิง
6. ปัจจุบันอายุ.....ปี
7. การศึกษา () ต่ำกว่า ป.6 () ป.6
() ม.1-ม.3 () ประกาศนียบัตรอาชีวศึกษา
() ม.4-ม.6 () อื่น ๆ ระบุ.....
8. ประสบการณ์การประกอบการค้าอาหาร.....ปี

ตอนที่ 2

9. ท่านเคยได้รับการอบรมเกี่ยวกับการสุขาภิบาลอาหารจากเจ้าหน้าที่สาธารณสุขหรือไม่
() เคย ถ้าเคย ก็ครั้ง.....เมื่อไหร่.....
() ไม่เคย
10. ท่านคิดว่าผู้ประกอบการค้าอาหารหรือผู้สัมผัสอาหาร ควรผ่านการอบรมสุขวิทยาส่วนบุคคล และสุขวิทยาอาหารก่อนที่จะปฏิบัติงานหรือไม่
() ควร เพราะ.....
() ไม่ควร เพราะ.....
11. ถ้าท่านหรือผู้สัมผัสอาหารป่วยเป็นโรค เช่น ไข้หวัด ไข้ไทฟอยด์ บิด ท้องร่วง ท่านจะอย่างไร
() ปฏิบัติงานต่อไปตามปกติ
() ซักยารับประทานเอง
() ไปพบแพทย์แล้วกลับมาทำงานตามปกติ
() ให้หยุดงานพักรักษาตัวจนกว่าจะหายจึงกลับมาทำงานตามปกติ
() อื่น ๆ ระบุ.....

12. ท่านเคยตรวจสุขภาพประจำปีบ้างหรือไม่

- () เคย ตรวจที่.....ปีละกี่ครั้ง.....
- () ไม่เคย

13. ท่านคิดว่าโรคสามารถแพร่จากผู้ปรุงและผู้เสิร์ฟอาหารไปยังผู้บริโภคได้หรือไม่

- () ได้
- () ไม่ได้
- () ไม่ทราบ

14. ท่านคิดว่าการพูดคุยระหว่างการปรุง การจัดจำหน่ายและการเสิร์ฟอาหารนั้น สามารถแพร่กระจายเชื้อโรคไปสู่ผู้บริโภคได้หรือไม่

- () ได้
- () ไม่ได้
- () ไม่ทราบ

15. ท่านสุขบุหรืหรือไม่

- () สุข
- () ไม่สุข

16. หลังจากเข้าห้องน้ำห้องส้วม ท่านจะทำอย่างไร

- () ล้างด้วยน้ำและสบู่
- () ล้างด้วยน้ำอย่างเดียว
- () ไม่ได้ล้าง

17. ขณะทำการปรุงอาหารท่านสวมรองเท้าแบบใด

- () แบบหุ้มส้น เพราะ.....
- () แบบไม่หุ้มส้น เพราะ.....
- () แบบใดก็ได้

18. ท่านคิดว่าผู้สัมผัสอาหารควรไว้เล็บหรือไม่

- () ควรไว้เล็บ เพราะ.....
- () ไม่ควรไว้เล็บ เพราะ.....
- () ไม่มีความเห็น เพราะ.....

19. เวลาไอ หรือจาม ควรใช้ผ้าเช็ดหน้าหรือกระดาษปิดปากและจมูกเสมอหรือไม่

- () ควร
- () ไม่ควร
- () ไม่มีความเห็น

20. การไอหรือจาม สามารถแพร่เชื้อสู่ผู้บริโภคอาหารได้หรือไม่

- () ได้
- () ไม่ได้
- () ไม่มีความเห็น

21. ถ้าท่านมีบาดแผลที่มือและมีหนอง ควรหยุดงานชั่วคราวหรือไม่

- () ควรหยุด
- () ไม่ควรหยุด
- () ไม่มีความเห็น

22. ท่านควรผูกผ้ากันเปื้อนหรือเอี๊ยม ทับการแต่งกายอีกชั้นหนึ่งหรือไม่

- () ควร
- () ไม่ควร
- () ไม่มีความเห็น

23. ท่านคิดว่ามีความจำเป็นที่จะต้องคลุมผมด้วยตาข่ายหรือหมวกคลุมผลขณะปฏิบัติงานหรือไม่

- () จำเป็น เพราะ.....
- () ไม่จำเป็น เพราะ.....
- () ไม่มีความเห็น

24. ท่านเห็นด้วยกับการใช้ผ้าเช็ดภาชนะใส่อาหาร ช้อน ตะเกียบภายหลังจากการล้างเสร็จเพื่อทำให้แห้ง หรือก่อนนำภาชนะมาใช้ใส่อาหารหรือไม่

- () เห็นด้วย
- () ไม่เห็นด้วย
- () ไม่มีความเห็น

25. ท่านใช้ผ้าเช็ดภาชนะหรือไม่

- () ใช่
- () ไม่ใช่

26. ท่านคิดว่าการใช้ผ้าเช็ดภาชนะให้แห้งก่อนนำไปใส่อาหารให้แก่ลูกค้าเพื่อบริโภคนั้นเป็นการแพร่เชื้อโรคได้หรือไม่

- () แพร่เชื้อโรคได้
- () ไม่แพร่เชื้อโรค
- () ไม่มีความเห็น

27. ท่านเห็นด้วยหรือไม่ว่าการนำภาชนะมาใช้ต้องไม่ให้นิ้วมือสัมผัสกับบริเวณของภาชนะที่จะสัมผัสอาหาร

() เห็นด้วย

() ไม่เห็นด้วย

() ไม่มีความเห็น

28. ท่านเชื่อหรือไม่ว่าถ้านิ้วมือสัมผัสภายในภาชนะก่อนนำไปใช้เป็นสาเหตุของการแพร่เชื้อโรคได้ทางหนึ่งไปยังผู้บริโภคได้

() เชื่อ

() ไม่เชื่อ

() ไม่มีความเห็น

29. ท่านคิดว่าการทำความสะอาดพื้น ผิวผนังหรือเพดานในร้านจำหน่าย ควรจัดทำเวลาไหน

() เวลาเข้าก่อนเปิดร้าน

() หลังเลิกกิจการประจำวัน

() เวลาใดก็ได้

() เวลาเข้าก่อนเปิดร้านและหลังเลิกกิจการประจำวัน

() ไม่มีความเห็น

30. ในรอบปีที่ผ่านมามีท่านเคยป่วยเป็นโรค, ไม่สบายหรือไม่

() เคย เป็น.....

() ไม่เคย

31. ข้อคิดเห็นในการจัดการสุขาภิบาลอาหารในโรงเรียน

.....

.....

.....

.....

.....

ภาคผนวก ข.

แบบสังเกตพฤติกรรมทางด้านสุขาภิบาลอาหาร

1. ผ้ากันเปื้อน

- 1.1 อุปกรณ์ ☐ มี ☐ ไม่มี
- 1.2 สี ☐ ขาว ☐ สีอ่อน ☐ สีเข้ม ☐ สีอื่น ๆ
- 1.3 การใช้ ☐ ตลอดเวลา ☐ บางครั้ง ☐ ไม่ใช้

2. การปกปิดอาหาร

- 2.1 อุปกรณ์ ☐ มี ☐ ไม่มี
- ได้แก่.....ตู้กระจก.....ด้าน
-ฝาภาชนะ
-ผ้าขาวบาง
-อื่น ๆ

2.2 การปกปิดอาหาร

- ☐ ตลอดเวลา ☐ บางเวลา ☐ ไม่ใช้

3. การทำความสะอาดภาชนะ

- 3.1 วิธีการล้าง ☐ ผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างจาน + น้ำ + น้ำ
- ☐ ผงซักฟอกหรือน้ำยาล้างจาน + น้ำ
- ☐ อื่น ๆ

3.2 ความสูงของที่ล้าง

- ☐ 60 ซม. ขึ้นไป
- ☐ น้อยกว่า 60 ซม.
- ☐ ที่พื้น

3.3 อุปกรณ์การล้าง

- ☐ อ่าง.....ตอน
- ☐ มีท่อระบายน้ำ
- ☐ ไม่มีท่อระบายน้ำ
- ☐ กาละมัง.....ใบ
- ☐ อื่น ๆ

3.4 การทำภาชนะให้แห้ง

ภาชนะ	การผึ่ง	การเช็ด	อื่น ๆ
จาน, ชาม			
ช้อน, ส้อม			
ตะเกียบ			
แก้ว			

4. การวางช้อน, ส้อม, ตะเกียบ

4.1 ลักษณะการวาง	ช้อน/ส้อม	/ตะเกียบ
.....		วางตั้งเอาด้านขึ้น
.....		วางนอนเรียงไปทางเดียวกัน
.....		วางนอนสลับกัน
.....		วางตั้งสลับกันไม่แน่นอน
.....		วางตั้งเอาด้านลง
.....		อื่น ๆ

4.2 ภาชนะที่ใส่

.....ตะกร้าโปร่ง
กระป๋องพลาสติกทึบ
อื่น ๆ

5. ภาชนะใส่น้ำส้ม, น้ำปลา

5.1 ชนิด	ภาชนะ น้ำส้ม/น้ำปลา	ช้อนตัก น้ำส้ม/น้ำปลา
.....		แก้ว
.....		สเตนเลส
.....		กระเบื้องเคลือบ
.....		สังกะสีเคลือบ
.....		พลาสติก
.....		อื่น ๆ

5.2 การปกปิดเครื่องปรุง

อุปกรณ์ () ฝาภาชนะ () ผ้าขาวบาง () ฝาชี
 () อื่น ๆ () ไม่มี

ลักษณะการปกปิด

() ทั้งหมด () บางส่วน () ไม่มี

6. การใช้สารปรุงแต่งอาหาร

	ราคา	ทะเบียน&เครื่องหมาย	ทะเบียน	ไม่ใช่	ขายอาหาร
		มาตรฐาน			ที่ไม่ต้องใช้
น้ำปลา					
น้ำส้มสายชู					
สี					
ผงชูรส					

7. ความสะอาด, เป็นระเบียบของร้านจำหน่ายอาหาร

	มาก	ปานกลาง	น้อย
พื้น			
บริเวณที่ปรุง, เตรียม			
บริเวณที่จำหน่าย			
บริเวณที่ล้างภาชนะ			
ความเป็นระเบียบ			

ภาคผนวก ค.

แบบสำรวจร้านอาหารและโรงอาหารของสถาบัน
ตามมาตรฐานการสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

แบบสำรวจร้านอาหารและโรงอาหารของสถาบัน

ตามมาตรฐานการสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

□ □ □ □ □ □ □ □

ร้านอาหาร

ชื่อร้าน.....

ที่อยู่ เลขที่..... หมู่ที่..... ซอย..... ถนน..... ตำบล.....

อำเภอ..... จังหวัด..... เขต(เทศบาล/สุขาภิบาล).....

ชื่อเจ้าของร้าน..... ขนาดของร้าน ☐ ใหญ่ ☐ เล็ก

ประเภทอาหารที่จำหน่าย.....

□ □ □ □ □ □ □ □

โรงอาหาร

ชื่อโรงอาหาร.....

สังกัด.....

ที่อยู่ เลขที่..... หมู่ที่..... ซอย..... ถนน..... ตำบล.....

อำเภอ..... จังหวัด..... เขต(เทศบาล/สุขาภิบาล).....

ลักษณะการให้บริการ ☐ 1. หน่วยงานดำเนินการเองทั้งหมด

☐ 2. ให้บุคคลภายนอกเข้ามาจำหน่าย จำนวน.....ราย

☐ 3. มีทั้ง 1 และ 2 จำนวน.....ราย

สรุปผลการสำรวจ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
มาตรฐานที่ได้				
ชื่อผู้สำรวจ				
วัน เดือน ปี ที่สำรวจ				

คำชี้แจง

แบบสำรวจนี้ใช้สำหรับร้านอาหารและโรงอาหารของสถาบันทั่วไป (ยกเว้นโรงครัวของโรงพยาบาล) โดยมีหลักเกณฑ์ดังนี้

ก. ร้านอาหาร แบ่งเป็น 2 ขนาดดังนี้

1. ร้านอาหารขนาดเล็ก หมายถึง ร้านอาหารที่มีขนาดไม่เกิน 2 คูหา

มีมาตรฐานดังนี้

1.1 มาตรฐานดี ต้องปฏิบัติตามข้อ □ ครบ 15 ข้อ

1.2 มาตรฐานดีมาก ต้องปฏิบัติตามข้อ □ และ □ ครบ 20 ข้อ

2. ร้านอาหารขนาดใหญ่ หมายถึง ร้านอาหารที่มีขนาดตั้งแต่ 3 คูหา

ขึ้นไป มีมาตรฐานดังนี้

2.1 มาตรฐานดี ต้องปฏิบัติตามข้อ □ และ □ ครบ 20 ข้อ

2.2 มาตรฐานดีมาก ต้องปฏิบัติตามข้อ ครบ 30 ข้อ

หมายเหตุ 1 คูหา หมายถึง ขนาดอาคารพาณิชย์ 1 ห้อง 1 ชั้น

รายละเอียดโปรดดูในคู่มือการใช้แบบสำรวจฯ

ข. โรงอาหาร กำหนดใช้มาตรฐานเดียวกันทั้งหมด ดังนี้

1. มาตรฐานดี ต้องปฏิบัติตามข้อ □ และ □ ครบ 20 ข้อ

2. มาตรฐานดีมาก ต้องปฏิบัติตามข้อ ครบ 30 ข้อ

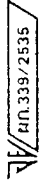
เรื่อง	รายละเอียดมาตรฐาน	ผลการสำรวจ				หมายเหตุ
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
จ. การรวบรวมขยะ และ น้ำโสโครก	21. เขียนต้องมีสภาพดี ไม่แตกร้าวหรือเป็นร่อง มีเขียงใช้เพาะอาหารสุก และอาหารดิบ แยกจากกัน และมีผ้าชีลครอบ (ยกเว้นครัวที่มีการป้องกันแมลงวันแล้ว)					
	22. ใช้ถังขยะที่ยักรั้วซีมและมีฝาปิด					
	23. มีท่อหรือรางระบายน้ำ ที่มีสภาพดี ไม่แตกร้าว ระบายน้ำจากห้องครัว และที่ล้างภาชนะ อุปกรณ์ ลงสู่ท่อระบายหรือแหล่งบำบัดได้ และต้องไม่ระบายน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำ สาธารณะโดยตรง					
	24. มีบ่อดักเศษอาหาร และดักไขมัน ที่ใช้การได้ดี ก่อนระบายน้ำเสียทิ้ง					
ฉ. ห้องน้ำ ห้องส้วม	25. ห้องน้ำห้องส้วมต้องสะอาด ไม่มีกลิ่นเหม็น มีน้ำใช้เพียงพอ					
	26. ห้องส้วมแยกเป็นสัดส่วน ประตูไม่เปิดสู่บริเวณที่เตรียม-ปรุงอาหาร ที่ล้างและเก็บภาชนะอุปกรณ์ ที่เก็บอาหาร และต้องมียางล้างมือที่ใช้การได้ดี อยู่ในบริเวณห้องส้วม					
	27. แต่งกายสะอาด สวมเสื้อมีแขน					
	28. ผู้ค้ากันเปื้อนเสืหรือมีเครื่องแบบ ผู้ปรุงจะต้องใส่หมวกหรือเขาคสุมนมด้วย					
ข. ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ	29. ต้องเป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคติดต่อ ไม่เป็นโรคผิวหนัง สำหรับผู้ปรุงจะต้องมีหลักฐาน การตรวจสอบสุขภาพในปัจจุบันให้ตรวจสอบได้					
	30. มีสุขนิสัยที่ดี เช่น ดัดเล็บสั้น ไม่สูบบุหรี่ในขณะปฏิบัติงาน					

กองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข โทร. 281-4864

เรื่อง	รายละเอียดมาตรฐาน	ผลการสำรวจ				หมายเหตุ
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
จ. ภาชนะอุปกรณ์	11. อาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว เก็บในภาชนะที่สะอาด มีการปิดสูงจากพื้น อย่างน้อย 60 ซม.					
	12. มีตู้สำหรับปิดอาหารที่ปรุงเสร็จแล้วและด้านหน้าของตู้ต้องเป็นกระจก น้ำดื่ม เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ต้องสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด มีก๊อกหรือ ทางเทร้น้ำ หรือมีอุปกรณ์ที่มีฝาดำสำหรับดักโดยเฉพาะ และวางสูงจากพื้น อย่างน้อย 60 ซม.					
	14. น้ำแข็งที่ใช้บริโภคต้องสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด มีอุปกรณ์ที่มีฝาดำสำหรับ ดับหรือดักโดยเฉพาะ วางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. และต้องไม่มีสิ่งของอื่น แร่รวมไว้					
	15. ภาชนะอุปกรณ์ เช่น จาน ชาม ช้อน และส้อม ต้องทำด้วยวัสดุที่ไม่มีพิษภัย เช่น สแตนเลส กระเบื้องเคลือบขาว แก้ว อลูมิเนียม เมลามีนสีขาวหรือสีอ่อน สังกะสีเคลือบขาว สำหรับตะเกียบต้องเป็นไม้ไม่ตกแต่สีหรือพลาสติกขาว					
	16. ภาชนะใส่น้ำส้มสายชู น้ำปลา และน้ำจิ้ม ต้องทำด้วยแก้ว กระเบื้องเคลือบขาว มีฝาปิด และข้อแนดกทำด้วยกระเบื้องเคลือบขาวหรือสแตนเลส สำหรับเครื่องปรุงรสอื่นๆ ต้องใส่ในภาชนะที่ทำความสะอาดง่าย มีฝาปิด และสะอาด					
	17. ล้างภาชนะอุปกรณ์ด้วยวิธีการอย่างน้อย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 ล้างด้วยน้ำยา ล้างภาชนะ และขั้นตอนที่ 2 ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล และอุปกรณ์การล้างต้องสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.					
	18.ใช้อ่างล้างภาชนะอุปกรณ์ที่มีท่อระบายน้ำที่ใช้การได้อย่างน้อย 2 อ่าง					
	19. จาน ชาม ถ้วย แก้วน้ำ ถาดหลุม ฯลฯ เก็บเก็บในภาชนะโปร่งสะอาดหรือตะแกรง วางสูง จากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือเก็บในภาชนะหรือสถานที่ที่สะอาดมีการปิด					
	20. ช้อน ส้อม ตะเกียบ วางตั้งเอาด้ามขึ้นในภาชนะโปร่งสะอาด หรือวางเป็นระเบียบ ในภาชนะที่สะอาด และมีการปิด ตั้งสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.					

วิธีการใช้แบบสำรวจฯ ให้แสดงเครื่องหมาย "✓" ในช่องผลการสำรวจหลังข้อมูลจริงที่ถูกต้องครบถ้วนทุกรายการ
 ให้แสดงเครื่องหมาย "X" ในช่องผลการสำรวจหลังข้อมูลจริงที่ยังไม่ถูกต้องหรือถูกต้องไม่ครบถ้วน
 ให้แสดงเครื่องหมาย "—" ในช่องผลการสำรวจหลังข้อมูลจริงที่ ไม่มีกิจกรรมที่ระบุไว้ในข้อมูลพื้นฐานและไม่ใช่ปัญหาทางด้านสุขภาพ

ให้ถือว่าผ่านมาตรฐานในข้อนี้

เรื่อง	รายละเอียดมาตรฐาน	ผลการสำรวจ				หมายเหตุ
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	
ก. สถานที่รับประทานอาหาร และบริเวณทั่วไป	1. สะอาด เป็นระเบียบ					
	2. ได้ แก้อ้อ สะอาด แข็งแรง จัดเป็นระเบียบ					
ข. สถานที่เตรียม-ปรุงอาหาร	3. มีการระบายอากาศที่ดี และ สำหรับห้องรับประทานอาหารที่มีเครื่องปรับอากาศต้องมีเครื่องดูดอากาศ รวมทั้งติดตั้งเครื่องหมาย"ห้ามสูบบุหรี่"ไว้ด้วย					
	4. สะอาด เป็นระเบียบ พื้นทำด้วยวัสดุผิวเรียบ เชื้อ เรียบ สภาพดี					
ค. ตัวอาหาร น้ำ น้ำแข็ง เครื่องดื่ม	5. มีการระบายอากาศรวมถึงกลิ่น และ ศักยภาพการที่อาหารได้ดี เช่น มีปล่องระบายควันหรือพัดลมดูดอากาศที่ใช้การได้ดี					
	6. ไม่เตรียม และ ปรุงอาหารบนพื้น					
	7. ได้เตรียม-ปรุงอาหาร และ ผึ่งบริเวณเตาไฟต้องทำด้วยวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย (เช่น สแตนเลส กระเบื้อง) มีสภาพดี และพื้นได้ต้องสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.					
	8. อาหาร และเครื่องดื่ม ในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทต้องมีเลขทะเบียนตัวรับอาหาร เช่น  3339/2535					
	9. อาหารสด เช่น เนื้อสัตว์ ผักสด ผลไม้ และอาหารแห้ง ต้องมีคุณภาพดี แยกเก็บเป็นสัดส่วนไม่ปะปนกัน วางสุกจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. หรือเก็บในตู้เย็น ถ้าเป็นห้องเย็นต้องวางอาหารสูงจากพื้นอย่างน้อย 30 ซม. สำหรับอาหารสดต้องล้างให้สะอาดก่อนนำมาปรุง					
	10. อาหาร และ เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท มีคุณภาพดี เก็บเป็นระเบียบ สูงจากพื้นอย่างน้อย 30 ซม.					

ภาคผนวก ง.

ความเที่ยงของแบบสอบถาม

แบบสอบถามชนิดวัดความเที่ยงของแบบทดสอบโดยใช้สูตร คูเดอร์-ริชาร์ดสัน (Kuder - Richardson Reliability) เป็นการวัดความสอดคล้องภายใน

สัมประสิทธิ์แห่งความเที่ยงแบบคูเดอร์-ริชาร์ดสัน มีสองสูตรคือ K-R20 และ K-R21 (Mehrens and Lehmann 1975 : 47)

$$K-R20 ; r_{xx} = \frac{n}{n-1} \left| \frac{1 - \Sigma pq}{S_x^2} \right|$$

$$K-R21 ; r_{xx} = \frac{n}{n-1} \left| \frac{1 - X(n-X)}{nS_x^2} \right|$$

เมื่อ

r_{xx} = สัมประสิทธิ์แห่งความเที่ยง

n = จำนวนข้อสอบในแบบทดสอบ

p = สัดส่วนของคนที่ตอบข้อสอบได้ถูกต้อง

q = สัดส่วนของคนที่ตอบแต่ละข้อผิด ($q = 1-p$)

Σpq = ความแปรปรวนของคะแนนแต่ละข้อ (ผลคูณของสัดส่วนของผู้ที่ตอบถูกและผิด)
= เครื่องหมายแสดงผลบวกในที่นี้คือ Σpq เป็นผลบวกของ pq ของทุก ๆ ข้อ

S_x^2 = ความแปรปรวนของคะแนนของผู้ถูกทดสอบทั้งหมด (หรือแทนด้วย σ^2_x)

$$= \frac{\Sigma X^2}{N} - \left| \frac{\Sigma X}{N} \right|^2$$

$\bar{X}$ = มัชฌิมเลขคณิตของคะแนนผู้ถูกทดสอบทั้งหมด

สำหรับการศึกษานี้ใช้สูตร K-R20 เนื่องจาก สูตร K-R21 ใช้สำหรับกรณีที่มีข้อตกลงว่า ข้อสอบทุกข้อมีระดับความยากเท่ากัน นั่นคือค่า p คงที่ทุกข้อเพราะ K-R21 แปลงมาจาก K-R20 โดยวิธีพิชคณิตอย่างง่าย ๆ ถ้าไม่เป็นไปตามข้อตกลงดังกล่าว ค่า K-R21 จะต่ำลงเล็กน้อย K-R21 ใช้ได้กับข้อสอบที่ให้คะแนน 1 กับ 0 และ K-R20 ใช้กับแบบทดสอบที่ตัดสินได้ว่าถูกหรือผิด

จากการนำแบบสอบถามไปทดลองใช้ (Pre-test) กับกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่างที่จะศึกษา จำนวน 30 คน นำมาหาความเที่ยงและปรับปรุงแก้ไขก่อนที่จะนำไปใช้จริง ผลการหาความเที่ยงเป็นดังนี้

$$\Sigma X = 500$$

$$\Sigma X^2 = 8894$$

$$\bar{X} = 16.67$$

$$S^2_x = 18.58$$

$$\Sigma pq = 3.01$$

$$\begin{aligned} S^2_x &= \frac{\Sigma X^2}{N} - \left| \frac{\Sigma X}{N} \right|^2 \\ &= \frac{8894}{30} - \left| \frac{500}{30} \right|^2 \\ &= 296.47 - (16.67)^2 \\ &= 296.47 - 277.78 \\ &= 18.69 \end{aligned}$$

$$; \bar{X} = \frac{\Sigma X}{N} = \frac{500}{30} = 16.67$$

$$\begin{aligned} K-R20 &= \frac{n}{n-1} \left| \frac{1 - \Sigma pq}{S^2_x} \right| \\ &= \frac{21}{20} \left| \frac{1 - 3.01}{18.58} \right| \\ &= \frac{21}{20} [1 - 0.16] \\ &= \frac{21}{20} [0.84] \\ &= 0.882 \end{aligned}$$

สัมประสิทธิ์ความเที่ยงของแบบสอบถามชุดนี้คือ 0.882

การคำนวณขนาดตัวอย่าง กรณีประชากรมีขนาดใหญ่

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \sigma^2}{e^2}$$

$$\alpha = \text{ระดับนัยสำคัญ} = 0.05$$

$$Z_{\alpha/2} = \text{ค่าสถิติ Z ณ ตำแหน่ง} = 1.96$$

$$\sigma^2 = \text{ความแปรปรวนของประชากร}$$

$$e = \text{ขอบเขตความคลาดเคลื่อน}$$

$$= 4\sigma \times \text{เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดที่ยอมให้เกิดขึ้น}$$

$$= 4\sigma \times 5/100$$

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \sigma^2}{(4\sigma \times 0.05)^2}$$

$$= \frac{(1.96)^2 \sigma^2}{4\sigma^2 \times (0.05)^2}$$

$$= \frac{(1.96)^2}{4^2 \times (0.05)^2}$$

$$= 96.04$$

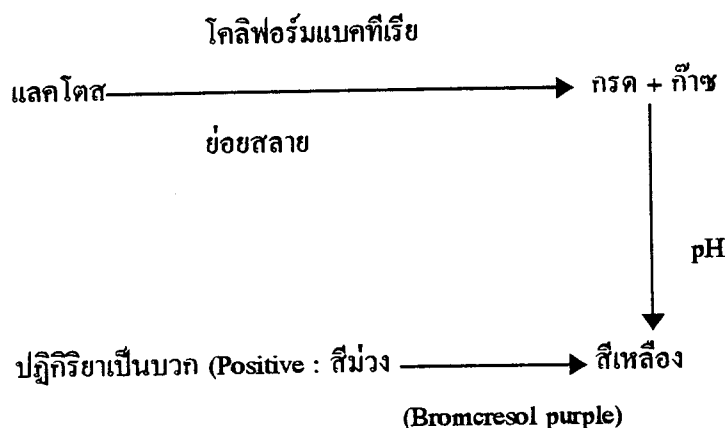
ดังนั้นขนาดตัวอย่างของการศึกษานี้เท่ากับ 96 ตัวอย่าง

ภาคผนวก จ.

การเตรียมชุดทดสอบแบคทีเรีย SI-2

หลักการทำงาน

ชุดทดสอบแบคทีเรีย SI-2 เป็นชุดทดสอบที่อาศัยหลักการคือ โคลิฟอร์มแบคทีเรียเมื่อย่อยสลายน้ำตาลจากแลคโตสจะทำให้เกิดกรดและก๊าซขึ้นมา กรดที่เกิดขึ้นจะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัด (indicator) คือ บรอมคลี ซอลเฟอเฟิล (Bromocresol purple, BCP) จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวถือว่าเป็นบวก (positive)



จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า จำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่มีอยู่ในอาหารมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา กล่าวคือ ถ้ามีโคลิฟอร์มแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่มาก ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีก็จะเกิดเร็ว และถ้ามีเชื้อโคลิฟอร์มปนเปื้อนอยู่น้อย ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีก็จะเกิดช้า จากแนวคิดนี้นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อที่มีกับระยะเวลาที่เกิดปฏิกิริยา พบว่า ตัวสารละลาย SI-2 เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ภายในเวลา 17 ชั่วโมง แสดงว่ามีเชื้อโคลิฟอร์มในตัวอย่างที่ทดสอบเกินเกณฑ์ชี้วัดคุณภาพทางแบคทีเรีย (กำหนดไว้ว่าในอาหารปรุงสำเร็จพร้อมบริโภคมีค่า MPN - Coliform ไม่เกิน 500)



ภาพที่ 1 แสดงการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ SL-2 จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เมื่อมีเชื้อ Coliform bacteria ในตัวอย่าง



ภาพที่ 2 แสดง Colony ของเชื้อ E.coli

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมชุดทดสอบแบคทีเรีย SI-2

สารเคมีที่ใช้

1. Bacto peptone, Difco
2. Bacto lactose, Difco
3. Sodium Desoxycholate, Fluka
4. Bromcresol purple, Fluka
5. น้ำกลั่น
6. HCL หรือ NaOH 1N เพื่อใช้ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง

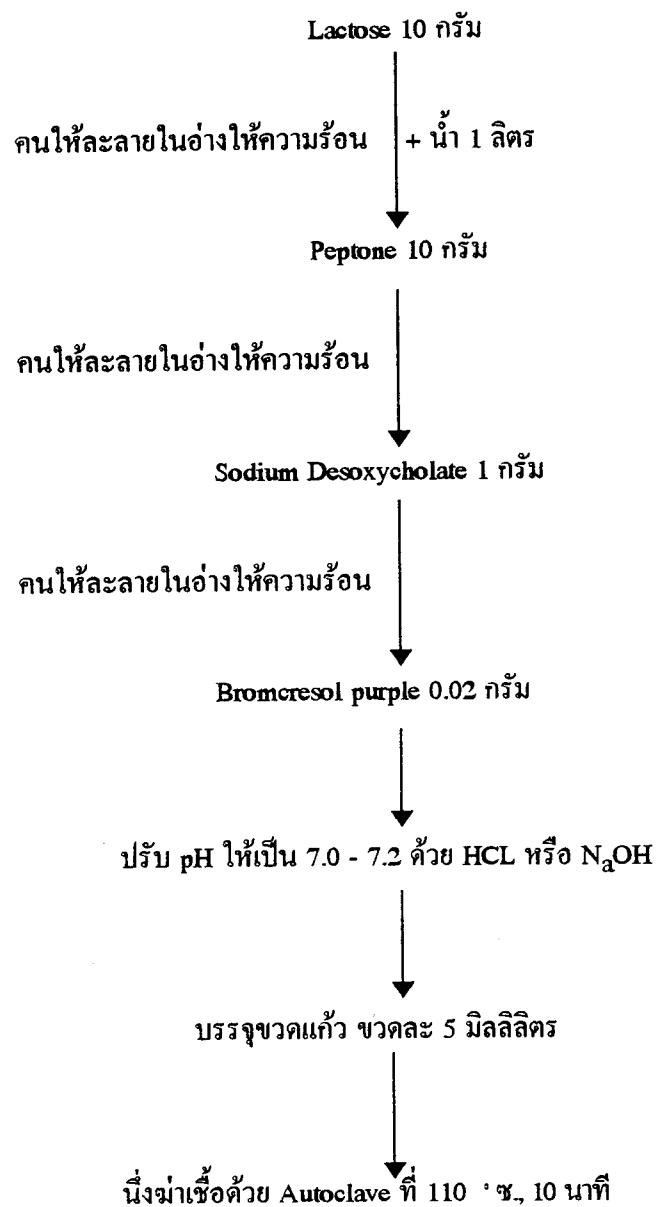
อุปกรณ์ที่ใช้

1. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Balance)
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. อ่างให้ความร้อน (water Bath) หรือแผ่นเหล็กนำความร้อน (Hot Plate)
4. เครื่องทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
5. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
6. บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Beaker)
7. ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Flask)
8. ขวดแก้วสำหรับบรรจุสารละลาย SI-2 (Bottle)
9. แฉบรัดปากขวด
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์

วิธีการเตรียมชุดทดสอบแบคทีเรีย SI-2 แบบสารละลาย

1. ชั่ง Lactose 10 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำ 1 ลิตร คนให้ละลายในอ่าง ให้ความร้อน จนสารละลายเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นไม่มีสี
2. เติม Peptone ลงไป 10 กรัม คนให้ละลายในอ่าง ให้ความร้อน
3. ใส่ Sodium desoxycholate 1 กรัม คนให้ละลายในอ่าง ให้ความร้อน
4. เติม Bromcresol purple 0.02 กรัม แล้วปรับ พี-เอช ให้เป็น 7.0-7.2 ด้วย HCL หรือ NaOH
5. บรรจุใส่ขวดแก้ว ขวดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาและสวมแฉบรัดปากขวดครอบฝาจุกลีดำ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที

การเตรียมชุดทดสอบแบคทีเรีย SI-2 แบบสารละลาย



การเก็บตัวอย่างในการศึกษาวิจัย

ในการตรวจสอบแบคทีเรียในอาหารและภาชนะอุปกรณ์ วิธีการเก็บตัวอย่างนับเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ถ้าการเก็บตัวอย่างกระทำไม่ถูกวิธี อาจมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียภายนอก จะทำให้การอ่านผลและแปลผลผิดพลาดได้ ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างอาหารหรือการ สวอปภาชนะอุปกรณ์ จึงควรระมัดระวังการปนเปื้อนจากแบคทีเรียภายนอก ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากมือผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งควรล้างมือให้สะอาดก่อนปฏิบัติงานจากอุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ซึ่งควรทำให้ปราศจากเชื้อก่อนนำมาใช้งานโดยผ่านขบวนการฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

อุปกรณ์ที่ใช้

1. ขวดบรรจุสารละลาย SI-2 ประมาณ 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. ไม้พันสำลี ห่อกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. ตะเกียบอัลกอฮอล์
4. ไม้ขีดไฟ
5. สติกเกอร์

วิธีการ สวอปภาชนะอุปกรณ์

1. ใช้ไม้พันสำลี 1 อันต่อชุดทดสอบ 1 ชุด และต่อภาชนะอุปกรณ์ 5 ชิ้นต่อ 1 ประเภท
 2. ถีกห่อกระดาษไม้พันสำลี นำไม้พันสำลีจุ่มในขวดน้ำยา นำไปป้ายผิวภาชนะอุปกรณ์ที่จะตรวจโดยป้ายพร้อมหมุนไม้ไปช้า ๆ 4 ตารางนิ้ว (2x2 นิ้ว) ป้ายซ้ำจุดเดิม 3 ครั้ง
 3. เมื่อป้ายผิวภาชนะครบ 3 ครั้งแล้ว นำไม้พันสำลีมาจุ่มในขวดน้ำยา แล้วหมุนไม้หลาย ๆ ครั้ง แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างขวด จึงนำไปป้ายภาชนะชิ้นต่อไป
 4. ทำเช่นนี้จนครบ 5 ชิ้น แล้วหักไม้ สวอป.โดยดึงไม้ให้โผล่ขึ้นมาจากปากหลอดประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วหักไม้กับปากขวดแก้ว ปลอ่ยให้ส่วนที่มีสำลีอยู่ในขวดน้ำยาแล้วปิดฝาขวดทันที
- หมายเหตุ : ทุกครั้งที่มีการเปิด-ปิดฝาขวดน้ำยา ลนไฟที่ปากขวดเพื่อฆ่าเชื้อโรคทุกครั้ง

วิธีการ สวอป.

1. แก้วน้ำ ถ้วย : สวอป.ครึ่งนิ้วจากขอบบนที่ภายนอกและภายใน
2. จาน ชาม ถ้วยขนม : สวอป.พื้นผิวที่สัมผัสอาหารประมาณ 4 ตารางนิ้ว
3. ช้อน ส้อม : สวอป.ที่ด้ามช้อน ส้อม ทั้งภายนอกและภายในที่สัมผัสอาหาร
4. ตะเกียบ : สวอป.ตะเกียบ 1 นิ้วครึ่ง รอบปลายซึ่งสัมผัสอาหาร

จากตัวอย่างที่เก็บ ลงบันทึกเวลาที่เก็บ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องอ่านผลที่ 17 ชั่วโมง

การอ่านผลเพื่อบันทึกรายงาน

1. ถ้าสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ภายใน 17 ชั่วโมง แสดงว่ามีเชื้อโคลิฟอร์ม ให้รายงานผลเป็นบวก (+, positive)
2. ถ้าสารละลายยังคงมีสีม่วงแดงหรือจางลงเล็กน้อย แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่มีเชื้อโคลิฟอร์ม ให้รายงานผลเป็นลบ (-, Negative)

การเก็บรักษาชุดทดสอบ

ชุดทดสอบที่เตรียมไว้เก็บไว้ในที่แห้งและเย็น โดยถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้องใช้ได้ประมาณ 1 เดือน ถ้าเก็บรักษาในตู้เย็น สามารถใช้ได้นานประมาณ 6 เดือน

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อผลการทดสอบทางแบคทีเรีย โดยใช้ชุดทดสอบ SI-2 เป็นบวก (positive) นำไปแยกชนิดของแบคทีเรีย เพื่อตรวจหาเชื้อ E.coli โดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical reaction)

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

สารเคมี

1. E.M.B. agar (Eosin Methylene blue agar); Difco
2. TSI agar (Triple sugar iron agar); Difco
3. Simmons citrate Agar ; Gifco
4. Lysine iron agar ; Difco
5. Motility test medium ; Difco
6. Urea Phenylalanine agar ; Difco
7. น้ำกลั่น
8. Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
9. Ferrous sulfate (FeSO_4)
10. Indicator
 - Phenol Red
 - Bromcresol purple
 - Bromthymol blue

อุปกรณ์ที่ใช้

1. ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave) ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและทำให้เครื่องมือเครื่องใช้ปราศจากจุลินทรีย์
4. ตู้อบความร้อน (Hot air oven) เป็นตู้บเพาะเชื้อโดยใช้ความร้อนแห้ง (dry heat) ที่อุณหภูมิสูงมาก ใช้ทำลายเชื้อวัตถุสิ่งของที่ทนความร้อน เช่น เครื่องแก้วต่างๆ เพื่อให้ปราศจากเชื้อก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองทางจุลชีววิทยา
5. ตะเกียงก๊าซ (Bunsen burner) ตะเกียงที่ใช้ก๊าซหุงต้มทำให้เกิดเปลวไฟ สำหรับใช้เพาะฆ่าเชื้อที่ติดอยู่กับเครื่องมือบางอย่างเช่น Loop, needle pipette หลอดทดลอง ปากกิบ
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. เข็มเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop and needle) ใช้สำหรับถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากภาชนะหนึ่งไปใส่ในภาชนะหนึ่ง ทำด้วยลวดที่เป็นตัวนำความร้อนที่ดี loop มีลักษณะเป็นเส้นลวดมีปลายขดเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 4 มม. ส่วน needle ปลายเหยียดตรง ก่อนจะใช้เครื่องมือทั้งสองนี้ต้องทำให้ปราศจากเชื้อโดยการเผาจนกระทั่งลวดร้อนแดง และปล่อยให้เย็นก่อนนำมาใช้
8. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) มีลักษณะคล้ายจานทรงกระบอกแบบตื้น 2 ใบสวมประกบกันสนิท ทำด้วยแก้ว หรือพลาสติกทนความร้อนใช้สำหรับใส่อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็ง (Agar) ทำให้มีบริเวณเนื้อที่ผิว (surface area) กว้างเหมาะในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่าง
9. หลอดเลี้ยงเชื้อ (cultertube) แบบปิดด้วยจุกเกลียว (Screw-cap test tube) ใช้บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่เป็นของแข็งประเภทวุ้น (agar) และของเหลว (broth)
10. หลอดดักก๊าซ (Durham tube) เป็นหลอดทดลองขนาดเล็กประมาณ 5x50 มม. ใช้สำหรับใส่คว่ำลงในหลอดทดลองขนาดปกติ ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ต้องการทดสอบความสามารถในการ ferment น้ำตาล แล้วให้กรดและก๊าซ CO_2 ก๊าซที่เกิดขึ้นจะลอยขึ้น จึงทำให้มีก๊าซจำนวนหนึ่งดันไล่ที่ของเหลวและถูกขังอยู่ที่ก้นหลอดดักก๊าซ
11. สีเขียนแก้ว (ดินสอเขียนแก้ว)
12. สติกเกอร์สำหรับ label รายละเอียดต่าง ๆ

การแยกชนิดของแบคทีเรีย ชนิด gram negative bacilli in family Enter boncteiaceac

1. หลังจากผลการทดสอบทางแบคทีเรีย โดยใช้ชุดทดสอบ SI-2 เป็นบวกลงเชื้อใน Eosin methylene blue agar incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. หลังครบเวลา Incubate ใช้ Sterile needle แตะเชื้อจากโคโลนีบน E.M.B. agar ลงใน Media ต่าง ๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Media	color	Method of inoculation
1. Triple Sugar Iron Agar	สีแดง	ใช้ needle ที่แตะเชื้อแล้ว stab ลงไปจนถึงก้น tube แล้ว streak บนผิว slant
2. Motile - Indole (MI)	ใส	Stab ให้เป็นเส้นตรงจนถึงก้น tube
3. lysine (L)	มัว	Stab ให้เป็นเส้นตรงจนถึงก้น tube
4. Urea-Phenylalanine Agar	เหลืองอ่อน	Streak บนผิว slant
5. Citrate (C)	เขียว	Streak บนผิว slant

จากนั้นนำไป incubate ที่ 37 C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผลปฏิกิริยาและผลจากการเลี้ยงเชื้อใน Biochemical media

1. ปฏิกิริยาของเชื้อบน TSI

TSI ใน differential media ซึ่งสามารถจำแนกแบคทีเรียโดยเฉพาะ family Enterobacteriaceae ออกเป็นกลุ่ม ๆ โดยอาศัยความสามารถของแบคทีเรียในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน media เช่น

- การ ferment น้ำตาลชนิดต่างๆ ใน media รวมทั้งมีการให้ก๊าซเกิดขึ้นหรือไม่
- ความสามารถของเชื้อว่าสามารถให้ก๊าซ H_2S หรือไม่

ปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกี่ยวข้อง

พวกแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae ทุกตัวสามารถที่จะ ferment glucose ได้

ในส่วนของ slant

ในส่วนนี้จะมีสภาวะเป็นแบบ aerobic, glucose จะถูกแบคทีเรียย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ $CO_2 + H_2O$ + พลังงานในท้ายที่สุด

ส่วน lactose และ sucrose ซึ่งเป็น disaccharide จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ที่เฉพาะเจาะจงได้เป็น monosaccharide ก่อน ดังนี้

Lactose $\longrightarrow$ glucose + galactose

Sucrose $\longrightarrow$ glucose + galactose

จากนั้น monosaccharide ต่าง ๆ จะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{พลังงาน}$

ในส่วนของ butt

ในส่วนนี้จะมีสภาวะเป็นแบบ anaerobic, glucose และน้ำตาลตัวอื่น ๆ จะถูกย่อยสลายแบบไม่สมบูรณ์ได้ end product เป็นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ และ/หรือก๊าซต่าง ๆ กับพลังงานออกมา ซึ่ง end product จากแบคทีเรียต่างชนิดกันก็จะต่างกันออกไป

นอกจากการใช้น้ำตาลแล้ว แบคทีเรียยังสามารถใช้ peptone ใน TSI เป็นแหล่งอาหารประเภทไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตได้ โดยสามารถเกิดได้ทั้งภาวะ aerobic และ anaerobic เมื่อ peptone ถูกย่อยสลาย จะได้ NH_2 ซึ่งจะทำให้ media มีสภาวะ เป็นด่าง

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบน TSI แยกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. Fermentation of Glucose Only

แบคทีเรียสามารถ ferment glucose ได้อย่างเดียวจะให้ปฏิกิริยาบน TSI เป็นแบบ alkaline slant (Red) และ acid butt (yellow) ซึ่งเขียนแทนที่ว่า K/A (Alkaline slant/Acid butt)

ภายใน 12 ชั่วโมงแรก จะมีการใช้ glucose ทั้งในส่วน of slant และ butt ซึ่งจะให้การออกมาและจะเปลี่ยนสีของ indicator คือ phenol red เป็นสีเหลืองทั้ง tube แต่อัตราการใช้ glucose ในส่วนของ slant จะเร็วกว่าใน butt เพราะมี aerobic

ดังนั้น glucose จะถูกใช้หมดก่อน เมื่อแบคทีเรียใช้ lactose หรือ sucrose ไม่ได้ ก็จะใช้ peptone แทนและได้สาร NH_3 ออกมา ทำให้สภาวะเป็นด่าง ดังนั้นในเวลาต่อมาในส่วนของ slant จึงมีสีแดง (หลัง incubate ครบ 18-24 ชั่วโมง) เพราะ indicator คือ phenol red ในสภาวะเป็นด่างจะมีสีแดง ในส่วนของ butt การ ferment น้ำตาลจะได้ stable acid products ซึ่งสะสมไว้มากทำให้ส่วนนี้ยังคงเป็นสีเหลือง

2. Fermentation of Glucose and lactase or sucrose

แบคทีเรียสามารถ ferment น้ำตาลได้ทั้ง glucose และ lactose หรือ sucrose และให้ปฏิกิริยาบน TSI เป็นแบบ acid slant (yellow) และ acid butt ซึ่งเขียนแทนที่ว่า A/A (Acid slant/Acid butt)

น้ำตาล lactose มีปริมาณมากกว่า glucose ถึง 10 เท่า เมื่อเชื้อใช้น้ำตาล glucose หมด ก็จะใช้น้ำตาล Lactose จึงทำให้ media มีสภาวะเป็นกรดตลอดเวลาในช่วง 18-24 ชั่วโมง ดังนั้น media จึงมีสีเหลืองตลอดเวลา แต่ถ้าอ่านผลหลัง 48 ชั่วโมงหรือนานกว่านั้น ปฏิกิริยาจะกลายเป็น K/A เพราะเมื่อ lactose ถูกใช้หมด เชื้อจะหันมาใช้ peptone แทน ทำให้ส่วนของ slant เป็นด่างจึงมีสีแดง

จะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็น lactose fermenter จะให้ปฏิกิริยาบน TSI เป็นแบบ A/A เสมอ ในทางกลับกัน ถ้าปฏิกิริยาบน TSI เป็น A/A เราจะบอกว่าเชื้อนั้นเป็นพวก lactose fermenter เสมอไปไม่ได้ เพราะเชื้อที่เป็นพวก non-lactose fermenter แต่สามารถใช้น้ำตาล sucrose (มีปริมาณ 1%) ก็จะทำให้ TSI เป็นแบบ A/A เช่นกัน เช่น เชื้อ *Vibrio cholerae* etc

3. No Fermentation of Carbohydrate

เชื้อแบคทีเรียบางพวกโดยเฉพาะพวก Gram negative non-enteric bacilli จะไม่สามารถ ferment glucose lactose หรือ sucrose ได้แต่จะสามารถใช้ peptone ในทาง media ได้ ซึ่งการใช้ อาจจะเป็นแบบ aerobic หรือ anaerobic ก็ได้

ถ้าใช้ peptone แบบ aerobic อย่างเดียว จะทำให้เฉพาะส่วนของ slant เป็น ต่าง แต่ในส่วน of butt จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้น ปฏิกิริยาบน TSI จะเป็นแบบ alkali line slant และ Neutral (Nochange) ในส่วนของ butt เขียนแทนได้เป็น K/N (Alkaline slant/Neutral)

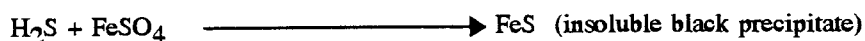
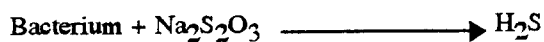
ถ้าใช้ peptone แบบ aerobic และ anaerobic ก็จะทำให้ทั้ง tube มีสถานะเป็นดัง ปฏิกิริยาบน TSI จะเป็นแบบ alkaline slant/alkaline butt (K/K)

นอกจากจะดูความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลต่าง ๆ กัน แล้วสามารถดูว่าการใช้น้ำตาลต่าง ๆ นั้นจะให้ก๊าซเป็น end product หรือไม่ ถ้าก๊าซที่ได้จากการใช้น้ำตาล คือ $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ พวกที่สามารถให้ก๊าซ (aerogenic) จะสังเกตได้จากการที่เกิดรอยแตกแยก หรือในกรณีที่เชื้อให้ก๊าซมาก ๆ อาจเห็น media ถูกดันลอยขึ้นจาก butt ได้ ส่วนพวกที่ไม่ให้ก๊าซ (anaerogenic) ก็จะไม่พบลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้น

นอกจากนี้ใน media ยังมีสารที่จะช่วยบอกว่า เชื้อที่จะให้ก๊าซ H_2S ออกมาหรือไม่ สารดังกล่าวได้แก่ sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) และ Ferrous sulfate (FeSO_4)

โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังนี้

acid environment



เนื่องจากก๊าซ H_2S ที่เกิดขึ้นจะไม่มีสี จึงต้องมีสาร FeSO_4 ใน media ด้วย เพื่อจะเป็น indicator ที่จะบอกว่าเชื้อนั้นสามารถให้ก๊าซ H_2S ออกมา โดยดูในส่วน of butt จะเห็นเป็นตะกอนสีดำ ในกรณีที่เชื้อให้ก๊าซ H_2S มาก ๆ ตะกอนที่เกิดขึ้นก็จะมีมากจนอาจจะทำให้ดูสีเหลือง

ของ acid butt ไม่ชัดเจน โดยทั่วไปแล้ว เชื่อที่สามารถ produce H_2S ได้ก็มักจะให้ก๊าซ CO_2+H_2 จากการ ferment น้ำตาลด้วย

สัญญาณลักษณะที่เขียนแทน reaction ของ TSI

A/A = Acid slant, Acid butt, no gas, no H₂S

A/AG = Acid slant, Acid butt, with gas, no H₂S

A/AG⁺ = Acid slant, Acid butt, with gas, H₂S produced

K/A = Alkaline slant, acid butt, no gas, no H₂S

K/AG = Alkaline slant, acid butt, with gas, no H₂S

K/AG⁺ = Alkaline slant, acid butt, with gas, H₂S produced

K/N = Alkaline slant, Neutral butt (nochange)

pH Indication

Phenol Red pH 6.8 = Yellow

8.4 = Red

Bromocresol purple pH 5.2 = Yellow

6.8 = purple

Bromthymol blue pH 6.0 = Yellow

ปฏิกิริยาและผลจากการเลี้ยงเชื้อใน Biochemical media

Media or tests	Reaction	Results	
		Positive	Negative
2. MI			
- Motile	เชื้อที่มี flagella สามารถเคลื่อนที่กระจายออกจากรอย stab และเจริญไปทั่วบริเวณ ทำให้ media ขุ่น	เห็นรอยแพร่กระจายหรือทำให้ media ขุ่น (cloudy)	เชื้อเจริญเฉพาะรอย stab
- Indole	เชื้อที่มีเอนไซม์ Tryptophanase สามารถแยกส่วนของ indole ออกจากโมเลกุลของ Tryptophane ทำให้ปฏิกิริยากับ kovac's Reagent ที่เติมลงไปจะได้สารชมพูแดง		
3. lysine	ในช่วง 10-12 ชม.แรก เชื้อจะ ferment น้ำตาล glucose	ม่วง (โดยเฉพาะส่วน	เหลือง (โดยเฉพาะ
ส่วน	ใน media และได้ acidic product ออกมาทำให้ media เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ถ้าเชื้อนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase ได้ ก็จะถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้น ตอนนี้ เพราะมีสภาวะที่เหมาะสมคือเป็น กรดพอสมควรและค่อนข้างจะเป็น anaerobic เอนไซม์ ดังกล่าว จะเร่งปฏิกิริยา decarboxylase	butt เท่านั้น)	butt เท่านั้น)

ปฏิกิริยาและผลจากการเลี้ยงเชื้อใน Biochemical media (ต่อ)

Media or tests	Reaction	Results	
		Positive	Negative
	tion ของ lysine ทำให้ได้สาร amine จึงทำให้เกิดภาวะเป็นด่างขึ้นและเปลี่ยนสีของ media จากเหลืองกลับเป็นม่วงอย่างเดิม ตัวเชื้อไม่สามารถสร้างเอ็นไซม์ได้ก็จะยังเห็น media เป็นสีเหลือง		
4. UP (**)			
- Urea	เชื้อสร้างเอ็นไซม์ Urease ซึ่งจะไปย่อยสาร urea ได้ 2 โมเลกุลของ NH ₃ ทำให้ media มีสภาวะเป็นด่าง ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ indicator คือ phenol red ให้เป็นสีชมพู	ชมพูเข้ม	ไม่เปลี่ยน
- Phenylalanine	เชื้อที่มีเอ็นไซม์ phenylalanine deaminase จะ deaminate สาร Phenylalanine ได้เป็น Phenylpyruvic acid ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ FeCl ₃ ที่เติมลงไปจะได้สาร Complex สีเขียวแกมน้ำเงิน		

ปฏิกิริยาและผลจากการเลี้ยงเชื้อใน Biochemical media (ต่อ)

Media or tests	Reaction	Results	
		Positive	Negative
5. Citrate	เชื้อที่สามารถใช้ citrate เป็นน้ำเงินเขียว แหล่งอาหารประเภทคาร์บอน (Carbon source) ก็สามารถใช้ ใช้ ammoniumsalt เป็น แหล่งอาหารประเภทไนโตรเจน (Nitrogen source) ได้ เมื่อ ammonium salt ถูก break down จะได้ NH_3 ซึ่งจะทำให้ indicator (Bromthymol blue) เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน		

* การอ่าน MI ให้อ่าน motile ตามวิธีการข้างต้นก่อน แล้วบันทึกผลไว้ จากนั้นหยด Kovac's Reagent (p-Dimethylaminobenzaldehyde) ลงไป 3-5 หยด เพื่อทดสอบ indol โดยค่อย ๆ เขย่า tube ไปมา

** การอ่าน up ให้อ่าน Urea test แล้วจึงทดสอบ Phenylalanine deaminase โดยการหยด 10% FeCl_3 ลงไป 2-3 หยด ค่อย ๆ หมุน tube ไปมาอ่านผลภายใน 1-2 นาที

วิธีการเตรียม Media ชนิดต่าง ๆ

1. TSI - Triple sugar iron agar ; Difco

1.1 ชั่งสาร TSI 59.5 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลาย ในอ่างให้

ความร้อน

1.2 ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.3 บรรจุใส่ tube แก้ว ปิดฝาจุกสีดำ แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปลอ่ยให้เย็นและแข็งตัวในแนวเอียง (ให้ผิวหน้าเอียง เรียก slant ส่วนก้น tube เรียก butt) pH 7.4 ± 0.2 at 25 C

2. Citrate - Simmon Citrate Agar ; Difco

2.1 ชั่งสาร 24.3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายในอ่างให้ความร้อน

2.2 ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.3 บรรจุลงในหลอดแก้ว

2.4 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที pH 6.9 ± 0.2 at 25 C

3. lysine - lysine iron Agar ; Difco

3.1 ชั่งสาร 34.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายในอ่างให้ความร้อน

3.2 ต้มให้ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.3 บรรจุลงในหลอดแก้ว

3.4 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที ที่ ความดัน 15 ปอนด์ pH 6.7 ± 0.2 at 25 C

4. Motile - Motility test medium ; Difco

4.1 เตรียมสาร 20 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายในอ่างให้ความร้อน

4.2 ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4.3 บรรจุลงในหลอดแก้ว 3 มิลลิลิตร

4.4 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ pH 7.2 ± 0.2 at 25 C

5. E.M.B Agar - Eosin Methylene Blue Agar ; Difco

5.1 เตรียมชั่งสาร 36 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายในอ่างให้ความร้อน

5.2 ต้มให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5.3 นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ pH 7.2 ± 0.2 at 25 C

5.4 นำ Media ที่ได้เทลงในจานเพาะเชื้อให้กระจายทั่วในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

6. Urea - Phenylalanine Agar ; Difco

6.1 ชั่งสาร L-Phenylalanine 0.5 กรัม Agar 6.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายในอ่างให้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

6.2 ชั่ง Urea Agar base 14.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปกรองและฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็นลง นำไปผสมกับสารที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1

6.3 บรรจุลงในหลอดแก้ว ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้แข็งตัว และให้ผิวหน้าอยู่ในแนวเอียง

ตารางการแยกเชื้อ Gram negative bacteria ใน family Enterobacteriaceae

Key for Identification of Gram Negative Bacilli (Enteric Bact.)

TSI	MI		L	UP		Citrate	Organisms
	Motile	Indole	Lysine	Urease	Phenyl		
A/A or A/AG							
	+(-)	+	+(-)	-	-	-	<u>Escherichia coli</u>
	+	-	-(+)	-(+w)	-	+	<u>Enterobacter spp.</u>
	-	-	+	+w	-	+	<u>Klebsiella spp.</u>
	+	+	-	+w(-)	-	+	<u>Citrobacter diversu</u>
A/A ⁺ or A/AG ⁺							
	+	+	-	+	+	-(+)	<u>Proteus vulgaris</u>
	+	-	-	+	+	+(-)	<u>Proteus mirabilis</u>
	+	-	+	-	-	+	<u>Arizona hinshawli</u>
	+	-	-	+w(-)	-	+	<u>Citrobacter freundii</u>
K/A or K/AG							
	+	+	-	+	+	+	<u>Proteus rettgerii</u>
	+	+	-	+	+	-	<u>Proteus morganii</u>
	+	+	-	-	+	+	<u>Providencia spp.</u>
	+	+	-	+w(-)	-	+	<u>Citrobacter diversus</u>
	+(-)	+	+(-)	-	-	-	<u>Escherichia coli</u>
	-	-(+)	-	-	-	-	<u>Shigella spp.</u>

TSI	MI		L	UP		Citrate	Organisms
	Motile	Indole	Lysine	Urease	Phenyl		
	+	-	+	-(+w)	-	+	<i>Enterobacter</i> spp.
	+	-	-	-	-	-	<i>Salmonella paratyphi</i>
K/A ⁺ or K/AG ⁺							
	+	+	-	+	+	-	<i>Proteus vulgaris</i>
	+	-	-	+	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
	+	+	+	-	-	-	<i>Edwardsiella tarda</i>
	+	-	-	+w(-)	-	+	<i>Citrobacter freundii</i>
	+	-	+	-	-	+	<i>Salmonella anizona</i>

+(-) = ส่วนใหญ่ให้ผล +ve ส่วนน้อยให้ผล -ve

-(+) = ส่วนใหญ่ให้ผล -ve ส่วนน้อยให้ผล +ve

+w = Weakly positive