บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

1.หอยทะเล 3 ชนิด ได้แก่ หอยแครง หอยลาย และหอยแมลงภู่ จากตลาดเทเวศน์,ตลาดกรุงธน, ตลาดราชวัตร, ตลาดบางขุนศรี และตลาดพรานนก ในเขตกรุงเทพมหานคร

2.แบคทีเรียที่ใช้ตรวจสอบความไวได้แก่ *V.parahaemolyticus*DMST22092, *V. harveyi*Centex14126และ *V.vulnificus*DBSWU4907001

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 5804R ของบริษัทMondotech(Thailand)
2.เครื่อง microfuge รุ่น 77 ของบริษัทSpectrafuge, U.S.A.
3.เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น GMC-260 ของบริษัท DAIHNA LABTECH
4.เครื่องชั่งรุ่น MS3002TS ของบริษัทเมทเลอร์-โทเลโด(ประเทศไทย) จำกัด
5.เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น UV-1700 ของบริษัท Shimadzu, U.S.A.
6.เครื่อง electrophoresis apparatusและอุปกรณ์ ของบริษัท BIO-RAD
7.เครื่อง thermal cyclerของบริษัท แล็บโฟกัส จำกัด
8.เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc) ของบริษัท SYNGENE BIO IMAGING
9.หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SX-700 ของบริษัทTomy KOGYO
10.ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัทITS(Thailand)
11.ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัทMemmert, Germany
12.ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น 7BZ-HF1200A 2-101 ของบริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด
13.ตู้แช่แข็ง -20°C ของบริษัท Sanyo, Thailand
14.Micropipette ของบริษัทกิบไทย
15.ฟิลเตอร์ทิป 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร ของบริษัทพริมาไซแอนติฟิก
16.หลอดเซนตริฟิวจ์ 1.5, 15 มิลลิลิตร ของบริษัทพริมาไซแอนติฟิก
17.หลอด thin walled 0.2 มิลลิลิตร ของบริษัท พริมาไซแอนติฟิก

18.จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก

19.เครื่อง hotplate stirrer รุ่น HTS-1003 ของบริษัท LMS laboratory & Medical Supplies

20. บีกเกอร์

21. แท่งแก้วคนสาร

22.ขวด Duran

23.หลอดทดลอง

24.กระบอกตวง

25.ช้อนตักสาร

26.ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

27.แท่ง Magnetic Stirrer

28.ฝาปิดหลอดทดลอง

29. Dropper

30.ตะเกียงแอลกอฮอล์

31.หลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 15 มิลลิลิตร

สารเคมี

1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ของบริษัทHimedia, India

2.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทไบล์ซอลท์ซูโครส (thiosulfate citratebile salt sucrose agar) ของบริษัทHimedia, India

3.Alkaline Peptone Water ของบริษัท Himedia, India

4.เอทิลแอลกอฮอลล์ (ethyl alcohol) ของบริษัท Merck, Germany

5. Sodium hydroxide ของบริษัท Riedel-de Haen, Germany

6. Sodium chloride ของบริษัท Ajax, Australia

7. Potassium chloride ของบริษัท Merck, Germany

8. Potassium hydrogen phosphate ของบริษัท Merck, Germany

9. Sodium hydrogen phosphate ของบริษัท Ajax, Australia

10. Primer ของบริษัท ธีระเทรดดิ้ง

11. Neo green ของบริษัท NeoScience

12. Agarose gel ของบริษัท vivantis

13. 10X TBE (Tris-base, Boric acid, 0.5M EDTA)

14. Boric Acid ของบริษัท AppliChem GmbH – An ITW

15.Tris base ของบริษัท vivantis, U.S.A

16. EDTA, U.S.A.

17. Triple Sugar Iron Agar ของบริษัท HiMedia, India

18.*Taq* polymerase ของบริษัท Vivantis, U.S.A

19. DNA HyperLadder 100 bpของบริษัท BioLine

วิธีดำเนินการทดลอง

1.การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนในเชื้อแบคทีเรีย*V.harveyi, V. parahaemolyticus* และ*V.vulnificus*ด้วยวิธี Multiplex PCR

1.1 ไพรเมอร์

ชุดไพรเมอร์และยีนที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi, V. parahaemolyticus* และ*V.vulnificus* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางนี้

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการทำ PCR

Gene	Primer Sequence (5'⟶3')	Amplicon Size(bp)
tlh	F-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG	450
	R-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	
rpoS	F-CAT GCG TGT TTC CTT GAT TC	273
	R-TCC ATA GCC TTT TTT CTA TTG G	
vhhP2	F-CAG CTC CCC GTT TTT TAA ACC	157
	R-CCA CCA TAT CCA TCG ATA TCT GTT	

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร TCBS มาทำการเพาะเลี้ยงให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยเชื้อมาละลายในสารละลาย PBS 100 µlในหลอด microcentrifuge 1.5 ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง เติม 25 mMNaOH 50 µl ในหลอด microcentrifugeที่มีตะกอน ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 mMTris-HCl 4 µl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

1.3 การทำ Multiplex PCR

ทำ Multiplex PCRโดยการนำส่วนผสม PCR reaction ดังตารางที่ 2 มาผสมในหลอด PCR แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *V. harveyi, V.parahaemolyticus*และ *V. vulnificus* โดยใช้สภาวะดังแสดงภายใต้เครื่อง PCR thermal cycler

สภาวะที่ใช้	Pre-denature	94°C	3	นาที
	Denature	94°C	30	วินาที
	Annealing	59°C	30	วินาที
	Extension	72°C	30	วินาที
	Final Extension	72°C	10	นาที
	จำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ			

จากนั้นนำมาตรวจสอบผลด้วยการทำgel electrophoresis โดยใช้ 1.5% Agarose gel กระแสไฟฟ้า 90V เวลา 60 นาที

ตารางที่ 2ส่วนผสมของ PCR reaction

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (µl)
50µM *rpos*-F	1
50µM *rpos*-R	1
50µM *tl*-F	1
50µM *tl*-R	1
50 µM *VhhP2*-F	1
50 µM *VhhP2*-R	1
2.5 mM dNTP	5

10X PCR buffer	5
50 mMKCl	5
50 mM $MgCl_2$	2.5
Taq polymerase	0.2
Distilled water	23.3
Template	3
ปริมาตรสุทธิ	50

2.การตรวจสอบความไวของ Multiplex PCR ในเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture)

การทดสอบความไวทำตามวิธีของ Yamazaki; et al.(2008a: 163) โดยดัดแปลงดังนี้นำแบคทีเรีย *V. harveyi*Centex 14126,*V.parahaemolyticus*DMST 22092และ*V. vulnificus*DBSWU 4907001มาเลี้ยงบน TCBS agar จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงใน tryptic soy broth (TSB) ที่มี 2% NaClปริมาณ 4 ml เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 40µl มาเลี้ยงต่อใน TSB ปริมาณ 4 ml อีกครั้ง แล้วนำไปบ่มที่เครื่องเขย่า 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่ในระยะ Mid-log phase (OD ที่ความยาวคลื่น 600 nm มีค่าเท่ากับ 0.5) นำแบคทีเรียมาทำ 10-fold serial dilutions ในสารละลาย PBS ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7}แล้วแบ่งแต่ละ dilutions มา 100 µl ใส่ในหลอด Microcentrifugeนำไป Centrifuge ที่ 13,000rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งส่วนตะกอนนำไปละลายด้วย 25 mMNaOHปริมาณ 50 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เป็นกลางโดยการเติม 1 mMTris-HCl buffer (pH 7.5) ปริมาณ 4 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000rpm เป็นเวลา5 นาที ดูดส่วนใสมา 1 µl ให้เป็น DNA templateในการทำ Multiplex PCRและการทดสอบโดยวิธีมาตรฐานพร้อมกันนี้ 10-fold serial dilutions ที่เตรียมไว้ข้างต้นมา 100 µl นำมา spread ลง TCBS เพื่อทำการนับจำนวนแบคทีเรียโดยเลือกที่ค่าความเจือจางที่สามารถนับแบคทีเรียได้จำนวน 30-300 colony forming units (CFUs) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณเชื้อที่ตรวจสอบได้เป็นค่า CFU/ml และ CFU per reaction

3.การคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi, V. parahaemolyticus* และ*V. vulnificus*ในหอยทะเลจากตลาดสด เขตกรุงเทพมหานคร

3.1 การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างหอยทะเลถูกสุ่มซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ตลาดเทเวศน์, ตลาดกรุงธน, ตลาดราชวัตร, ตลาดบางขุนศรี และตลาดพรานนก ซึ่งตัวอย่างหอยทะเลที่ถูกนำมาตรวจสอบ ได้แก่ หอยแครง, หอยลาย และหอยแมลงภู่ โดยหอยทะเลแต่ละชนิดจะถูกสุ่มมาอย่างละ 10 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบ จากนั้นนำหอยทะเลแต่ละชนิดมาทำการสับละเอียด

ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแต่ละชนิดอย่างละ 1 g จากนั้นเติม APW (Alkaline Peptone Water) 9 ml ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C เก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางกับสารละลาย PBS แบ 10-fold serials dilution โดยมีความเข้มข้น10^{-1} -10^{-4}จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง100 µl แต่ละความเจือจางไปทำ plate count บนอาหาร TCBS บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อดูปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ 0,3 และ 6 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับ พร้อมกับดูดสารละลายตัวอย่าง 100 µl แต่ละความเจือจางไปทำการสกัดดีเอ็นเอ

3.2 การคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi, V. parahaemolyticus*และ *V. vulnificus*ในหอยทะเลด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional biochemical test)

การทดสอบโดยวิธีมาตรฐานจากการตรวจดูความแตกต่างจากรูปแบบตามสัณฐานวิทยาบนอาหาร TCBS agar เช่น ลักษณะรูปร่าง ขนาดเส้นผ่านศูนย์ สีของโคโลนี และลักษณะขอบของโคโลนีที่แตกต่างกันจำนวน 20 โคโลนีนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีของ Barrow and Feltham (1993)และ Kaysner et al. (2004)ได้ทำการทดสอบ Oxidase, TSI, Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, Arginine decarboxylase, Indole, MR-VP และการทดสอบความสามารถในการใช้เปอร์เซ็นต์เกลือต่างๆ เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

3.3 การคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi, V. parahaemolyticus* และ*V. vulnificus*ในหอยทะเลด้วยวิธี Multiplex PCR

การเก็บรักษาของหอยทะเลทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หอยแครง, หอยลาย และหอยแมลงภู่ ถูกสุ่มซื้อจากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร โดยนำส่วนเนื้อของกลุ่มตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมา 1g โดยแต่ล่ะตัวอย่างถูกสับละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม 2% NaClAlkaline peptone water 9ml และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นนำตัวอย่าง 1g ที่สับละเอียดมาบ่มที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง แล้วทำ 10-fold serial dilution (1:100, 1:1000 and 1:1,000)ใน PBS แล้วนำ 100 µl ของแต่ละ dilution มา spread บน TCBS agar แล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อตรวจสอบจำนวนโคโลนี โดยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียต้องอยู่ในช่วง 30-300 (CFUs) และ CFU ml^{-1}ของโคโลนีที่สามารถนับได้โคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันนำมาละลาย phosphate buffer saline และดีเอ็นเอที่สกัดได้ (NaOH/Tris-HCl) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำทดสอบโดยวิธี Triplex PCR ที่มีความจำเพาะกับ *vhhP2* gene ของแบคทีเรีย *V. harveyi*, *tlh* gene ของแบคทีเรีย*V. parahaemolyticus* และ *rpoS* gene ของแบคทีเรีย *V. vulnificus* โดยแบคทีเรีย

*Vibrio*ทั้ง 3 สายพันธุ์ถูกระบุโดยการทดสอบทางชีวเคมี แต่ได้รับการยืนยันภายหลังโดยวิธี Multtiplex PCR

3.4 การเตรียมดีเอ็นเอ

สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่าง นำตัวอย่างมา 1g ใส่ใน APW 9 ml แล้วทำ 10-fold serial dilution ในสารละลายPBS (1:100, 1:1000 and 1:1,000)จากนั้นนำไปบ่มที่ 0, 3 และ 6ชั่วโมง โดยตัวอย่างที่เก็บแต่ละค่าความเจือจางที่เวลาต่าง ๆ ดูดมา 1 ml ถูกย้ายใส่ในหลอด microcentrifuge1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ส่วนตะกอนนำมา re-suspended ด้วย 25mM NaOH100 µlนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Tris-HCl8 µl (pH 7.5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาผสมประกอบด้วย 5 µl 10x PCR buffer, 5 µl 50mM $MgCl_2$, 4 µl 2.5 mMdeoxyribonucleotide phosphate, 5 µl of 500 mMKCl, 1 µl of each primer, 0.25 µl ของ 0.5 units *Taq* DNA polymeraseและ 1 µl template DNA และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 µl สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR คือ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที,Annealing ที่อุณหภูมิ 59°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และปฏิกิริยาสุดท้ายคือ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที และปฏิกิริยาจะสิ้นสุดเมื่อครบ 35 รอบ

4.การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Test)

นำโคโลนีที่เลี้ยงบน TCBS มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB โดยเตรียม TSB 0%, 3%, 6%, 8% และ 10% ปริมาณหลอดละ 10 ml และเตรียมอาหาร TSI เพื่อดูผล จากนั้นนำโคโลนี 1 ลูป นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB แต่ล่ะ % บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจเช็คผลเทียบกับตารางการพิสูจน์ของเชื้อ *Vibrio*

4.1การย้อมสีแบบแกรม

ทำความสะอาดแผ่นสไลด์ เช็ดให้แห้ง เลือกโคโลนีที่ต้องการย้อมแกรมมา 1 โคโลนี เกลี่ยบางๆ บนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry) และทำการตรึงเซลล์ด้วยความร้อน (heat fixed) โดยผ่านไฟประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นหยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นล้างสีออกโดยผ่านน้ำสะอาดจนกว่าสีจะออกหมดหรือเหลือสีประมาณ 20% แล้วหยด

สารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ย เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนออก แล้วชะด้วย Decolorize (สารละลายเอธิลแอลกอฮอล์) 95% (หรือเอธิลแอลกอฮอล์อะซิโตน) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างออกโดยการผ่านน้ำทันที และซับด้วยกระดาษซับ จากนั้นย้อมทับด้วยสี Safranin O ให้ท่วมรอยเกลี่ย เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกโดยผ่านน้ำสะอาด และซับด้วยกระดาษซับ ทิ้งไว้ให้แห้ง และตรวจสอบดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.2การทดสอบ Oxidase

เป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) โดยปกติจะใช้รีเอเจนต์ที่ไม่มีสี แต่จะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ โดยรีเอเจนต์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ tetramethyl-p-phenylenediaminedihydrochlorideหรือ dimethyl-p-phenylenediaminedihydrochloride เมื่อถูกออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้จะมีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ออกซิเดส จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม

วิธีการทดสอบ

ทำโดยการหยดสารละลายลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้เข็มหรือลูปเขี่ยเชื้อลงบนกระดาษกรองนั้น

การอ่านผล

-ผลบวก : จะเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มบนกระดาษกรองภายใน เวลา 10 นาที

- ผลลบ : ไม่มีสีเกิดขึ้น

4.3การทดสอบ Decarboxylase

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยกรดอะมิโนให้เอมีนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller decarboxylase medium ที่มีกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ ไลซีน, อาร์นิน และออร์นีทีน อย่างเดียวอย่างหนึ่งเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสและอินดิเคเตอร์ คือ bromcresol purple ในช่วงแรกของการบ่มเชื้อแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีเหลืองและอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสภาวะเป็นกรด ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสทำงาน หมายถึง มีการย่อยของกรดอะมิโนเกินขึ้นให้เอมีนที่มีผลทำให้เป็นด่าง ทำให้สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนกลับเป็นสีม่วง ดังนั้นในหลอดควบคุมที่มีส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน แต่ไม่มีกรดอะมิโน แบคทีเรียสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคสหลอดควบคุมควรให้สีเหลือง เพราะมีการใช้น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถใช้

น้ำตาลในสภาพที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถให้สีเหลืองก่อนได้ ดังนั้นการใช้กรดอะมิโนโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงให้สีม่วงเข้ม

การทดสอบ

ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ decarboxylase medium ทั้งในหลอดที่มีกรดอะมิโนและไม่มีกรดอะมิโน จากนั้นหยดพาราฟินลงไปให้สูงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1cm. และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

- ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีส้มแดงหรือแดง
- ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

4.4การทดสอบคาร์โบไฮเดรต

Mannitol, Mannose และ Cellobiose

นำMannitol, Mannose และ Cellobiose ที่มี phenol red เป็น indicatorแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลMannitol, Mannose และ Cellobioseได้ การทดสอบแบคทีเรียกลุ่ม*Vibrio* ต้องมีการเติม 2%NaClจึงเปลี่ยนสี indicator จากแดงเป็นเหลือง

วิธีทดสอบ

เพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารที่ผิวหน้า (slant) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การแปลผล

- ผลบวก : มีเชื้อขึ้นและอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีเหลือง
- ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

4.5การทดสอบ Indole

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน Trytophanเป็น Indole ได้หรือไม่ ซึ่ง Trytophanเป็น Amino Acid ชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำพวก Peptone Casein

วิธีการทดสอบ

บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน 1% Peptone Brothจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยด Kovac'Reagent 5 หยด จากนั้นเขย่าหลอดทดลองเบาๆ 2-3 ครั้งสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่ผิวของ Medium

การแปลผล

- ผลบวก : มีสีแดงที่ผิวของ Medium (Red Ring)
- ผลลบ : สีเหมือน Kovac'Reagent คือสีเหลือง

4.6 การทดสอบ MR-VP

Methyl Red

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Glucose ได้มากหรือน้อย โดยการมาตรฐานดู pH ของอาหารนั้น เชื้อที่สร้างกรดได้มากจะทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสี Indicator ของ Methyl Red เป็นสีแดงได้

วิธีการทดสอบ

บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปใน MR/VP Brothนำไปบ่มที่อุณหภูมิ35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด Methyl Red Test Reagent 5 หยด และสังเกตการเปลี่ยนสีผิวของ Medium ทันทีหลังจากหยด Indicator

การแปลผล

- ผลบวก : Medium เปลี่ยนเป็นสีแดง
- ผลลบ :Medium มีสีเหลือง

Voges-Prokauer

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง Acethyl Methyl Carbinol จาก Glucose ได้หรือไม่

วิธีทดสอบ

บ่มเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน MR/VP Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด 5% Naphtholลงไป 6 หยด แล้วเขย่า หยด 40% KOH ลงไป 2 หยดเขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 10-15 นาที และสังเกตการเปลี่ยนสีที่ผิวของ Medium

การแปลผล

- ผลบวก : Medium เปลี่ยนเป็นสีแดง
- ผลลบ : Medium เป็นสีเหลือง

5. การประเมินประสิทธิภาพความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy) และความจำเพาะ (Specificity) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานและวิธี Multiplex PCR

5.1 ความถูกต้องของวิธี

Accuracy (%) = [True positive/(True positive + False positive + False negative)] x 100

วิธีมาตรฐาน [22/(22 +0 + 2)x 100] = 91.67%

วิธี Multiplex PCR [24/(24 + 0 + 1) x 100] = 96%

5.2 ความจำเพาะของวิธี

Specificity (%) = [True negative/(True negative + False positive + False negative)] x 100

วิธีมาตรฐาน [1/(1 + 0 + 0) x 100] =100%

วิธี Multiplex PCR [3/(3 + 0 + 0) x 100] =100%