ในปี ค.ศ. 1992 รศ.ดร.วรัญญา แสงเพ็ชรส่อง ได้กล่าวถึงการประเมินคุณภาพอาหารทางด้านสุขาภิบาล (sanitary quality) โดยทำการตรวจนับเชื้อโดยตรง (direct plate count) ด้วยการนับหาจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร วิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่มีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนมากกว่า 100 เซลล์/กรัมอาหาร ถ้ามีเชื้อปนเปื้อนน้อยกว่า 100 เซลล์/กรัมอาหาร จะต้องทำการเพิ่มเชื้อเพื่อให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น และยับยั้งเชื้อตัวอื่นมิให้เจริญ โดยใช้หลักการเดียวกับการนับเชื้อโดยตรง แต่เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีความเข้มข้นของเกลือ 10%NaCl (TSB+10%NaCl) ทำการทดสอบตามหลักของการทำ MPN (most probable number) หลังการอบเพาะเชื้อแล้ว ถ้ามีเชื้อขึ้นโดยจะเห็นจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำมากระจายเชื้อ (streak) บน Baira-Parker agar จากนั้นดำเนินการพิสูจน์เชื้อว่าเป็น *S. aureus* สายพันธุ์ผลิต coagulase การอ่านค่า MPN ให้เทียบกับตารางรายงานเป็น MPN/กรัมอาหาร[3] และในปี ค.ศ. 1995 Brooks และคณะได้ศึกษาจากสิ่งส่งตรวจ เช่น หนองแผล (pus), เลือด (blood), หนองจากลำคอ (tracheal aspirate) หรือน้ำไขสันหลัง (spinal fluid) ที่มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือ 7.5%NaCl เพื่อที่จะยับยั้งเชื้อตัวอื่นมิให้เจริญนอกจาก *S. aureus*[4] ดังนั้นการวินิจฉัยจึงต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาคลินิก ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงชีพ เช่น blood agar ที่เป็น differential media สำหรับเพาะเชื้อแกรมบวก แกรมลบ เชื้อก่อโรค เชื้อไม่ก่อโรค และเป็น selective media ต่อเชื้อแกรมบวก เนื่องจากโคโลนีของเชื้อแกรมบวกบางชนิดจะให้ β-hemolysis, α-hemolysis รอบ ๆ โคโลนี แต่บางชนิดไม่ให้ hemolysis (γ-hemolysis) ส่วนน้อยใช้การเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ mannitol salt egg yolk agar (MSEY agar) ซึ่งเป็น selective media จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมลบ แต่เชื้อ *S. aureus* จะเจริญได้และให้ลักษณะโคโลนีชัดเจนคือ โคโลนีกลม สีเหลืองและมีโซนขุ่นรอบ ๆ โคโลนี[5-10] ดังนั้นจึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีจำเพาะต่อเชื้อ*S. aureus* คือ MSEY agar เปรียบเทียบกับ blood agar ด้วยวิธี direct plating โดยการเพาะเชื้อบน MSEY agar และบน blood agar และด้วยวิธี indirect plating โดยการเพาะเชื้อใน TSB+10%NaCl ก่อน (TSB+10%NaCl เป็น enrichment broth สามารถยับยั้งเชื้อตัวอื่นมิให้เจริญ ส่วน *S. aureus* จะสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากพอที่จะตรวจพบได้)[4,5,10] แล้วนำมาเพาะเชื้อบน MSEY agar และบน blood agar ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในอุจจาระ โดยการเพาะเชื้อบน MSEY agar เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อบน blood agar จำนวน 203 ตัวอย่าง ด้วยวิธี direct plating และวิธี indirect plating อุจจาระเก็บจากผู้ป่วยของศูนย์บริการสาธารณสุข สังกัดกรุงเทพมหานคร 10 ศูนย์ ระหว่าง พ.ย. 2542 ถึง ธ.ค. 2542

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา *S. aureus* จากอุจจาระผู้ป่วย (Stool culture) โดยการเพาะเชื้อบน MSEY agar กับการเพาะเชื้อบน blood agar ด้วยวิธี direct plating

2. เปรียบเทียบการตรวจหา *S. aureus* จากอุจจาระผู้ป่วย โดยการเพาะเชื้อบน MSEY agar กับการเพาะเชื้อบน blood agar ด้วยวิธี indirect plating

3. เปรียบเทียบการตรวจหา *S. aureus* จากอุจจาระผู้ป่วย โดยการเพาะเชื้อบน MSEY agar ด้วยวิธี direct plating กับวิธี indirect plating

4. เปรียบเทียบการตรวจหา *S. aureus* จากอุจจาระผู้ป่วย โดยการเพาะเชื้อบน blood agar ด้วยวิธี direct plating กับวิธี indirect plating

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. สิ่งส่งตรวจ

เก็บตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วย (Stool culture) จำนวน 203 ตัวอย่างจากศูนย์บริการสาธารณสุขสังกัดกรุงเทพมหานคร 10 ศูนย์ ระหว่าง พ.ย. 2542 ถึง ธ.ค. 2542

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Transport media
- Cary blair

2.2 Enrichment broth
- Trypticase soy broth with 10% sodium chloride (TSB+10%NaCl) (TSB : BBL, USA ; NaCl : บ. ศรีจันทร์สหโอสถ จก.)

2.3 Differential media
- blood agar (BBL, USA)

2.4 Selective media
- mannitol salt agar (BBL, USA)

2.5 Basic media
- Nutrient slant (BBL, USA)

2.6 อาหารที่ใช้ทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่
- plasma
- mannitol O/F
- gram stain reagent
- catalase test

- mineral oil

3. วิธีดำเนินการทดลอง โดยแบ่งการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* เป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.1 Direct plating method (MSEY agar และ blood agar)

นำไม้พันสำลีที่ป้ายอุจจาระจากขวด cary blair มาป้ายและกระจายเชื้อ (streak) ลงบน MSEY agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 24-48 ชั่วโมง และบน blood agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจหาลักษณะโคโลนีที่จำเพาะของ *S. aureus* บน MSEY agar คือโคโลนีกลม สีเหลืองและมีโซนขาวขุ่นรอบ ๆ โคโลนี ส่วนโคโลนีที่จำเพาะของ *S. aureus* บน blood agar คือโคโลนีกลม สีขาวขุ่น และมีโซนใส (β-hemolysis) รอบ ๆ โคโลนี

3.2 Indirect plating method (TSB+10%NaCI)

นำไม้พันสำลีที่ป้ายอุจจาระจากขวด cary blair มาเพาะเชื้อลงใน TSB+10% NaC1 นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำ TSB+10% NaC1 ที่อบเพาะเชื้อแล้ว ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำขาวขุ่น นำมาเขี่ยกระจายเชื้อ (streak) ลงบน MSEY agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 24-48 ชั่วโมง และบน blood agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจหาลักษณะโคโลนีที่จำเพาะบน MSEY agar และ blood agar เหมือนข้อ 3.1

3.3 จากข้อ 3.1 และ 3.2 เลือกโคโลนีที่สงสัยมา 2-3 โคโลนีมา streak ลงบน Nutrient agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°-37° ซ นาน 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้จาก Nutrient agar มาทดสอบทางชีวเคมีอื่น ๆ เพื่อยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus* (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบทางชีวเคมีอื่น ๆ เพื่อยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *S. aureus*

การทดสอบ	*S. aureus*
Cell morphology	G + clusters (grape like clusters)
Catalase	+
Coagulase	+
Mannitol O/F	+/+
Hemolysis	+(β)

ข้อมูลจาก : Eley AR. Microbial food poisoning 1992 : 42