รายการอ้างอิง

Arthur, G.H. 1979. Retention of the afterbirth in cattle a review and commentary. Vet. Ann. 19 : 26-36.

Baskerville, A. and Lloyd, G. 1977. A method for the collection of nasal epithelial cells and secretion from domestic animals Vet. Rec. 101 (9) : 168-170.

Ball, L., Olson, J.R. and Mortimer, R.G. 1984. Therapeutic considerations for the postpartum bovine uterus. Soc. for Therio. Newsletter 7 : 4-5.

Borsberry, S. and Dobson, H. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. Vet. Rec. 124 (9) : 217-219

Bretzlaff, K.N., Whitmore, H.L. Spahr, S.L. and Ott, R.S. 1982. Incidence and treatments of postpartum reproductive problems in a dairy herd. Theriogenology 17 : 527-535.

Callahan, C.J. 1969. Postparturient Infections of dairy cattle. J.A.V.M.A. 155(12) : 1963-1967.

Cowan, S.T. and Steel, K.J. 1974. In Mannual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. , Cambridge University Press.

Dawson, F.L.M. 1977. Reproductive potential in female cattle discarded as infertile. J. Reprod. Fertil. 51 : 53-56.

de Bois, C.H.N. 1961. Endometritis en vruchtbaarheid het rund. Ph.D. dissertation, University of Utrecht.

Dekruif, A. 1978. Factors influencing the fertility of cattle population. J. Reprod. Fertil. 54 : 507-518.

Diker, K.S., Arda, M. and Jzgur, H. 1968. Isolation of Acinetobacter calcoaceticus from cows with metritis. J. Vet. Med. 33(8) : 632-633.

Eduvie, L.O., Osori, D.I.K., Addo, P.B. and Njoku, C.O. 1984. Bacteriological investigation of the postpartum uterus : relationship to involution and histological findings. Theriogenology 21(5) : 733-745.

Elliott, L., McMahon, K.J., Gier, H.T. and Marion, G.B. 1968. Uterus of the cow after parturition : bacterial content. Am.J. Vet. Res. 29(1) : 77-81.

Erb, H.N. and Martin, S.W. 1980. Inter-relationships between production and reproductive diseases in Holstein cattle. J. Dairy Sci. 63 : 1911-1917.

Etherington, W.G., Martin, S.W., Cote, J.F., Doig, P., Leslile, K.E. and Bosu, W.T.K. 1984. The effect of GnRH and/or cloprostenol in the postpartum dairy cow. A field trial. Proc. Xth Int-Cong. Anim. Reprod. and AI. Urbana-Champaign, I : 317.

Frank, A.H. and Bryner, J.H. 1952. An instrument for collecting samples from the reproductive tract of cows for bacteriological study. J.A.V.M.A. : 97-98.

Frank, T., Anderson, K.L., Smith, A.R., Whitmore, H.L. and Gustafsson, B. 1983. Phagocytosis in the uterus : A review. Theriogenology 20 : 103-110.

Garcia, M. 1982. Postpartum reproductive functions in dairy cows. Master's Thesis , Sveriges Lanthruksunivefsitet, Uppsala.

Gier, H.T. and Marion, G.B. 1968. Uterus of the cow after parturition : Involutional changes. Am. J. Vet. Res. 29 : 83-96.

Griffin, J.F.T., Hartigan, P.J. and Nunn, W.R. 1974. Nonspecific uterine infection and bovine fertility. I. infection patterns and endometritis during the first seven weeks postpartum. Theriogenology 1 : 91-106.

Gelev, I. 1975. Bacterial infection in cows associated with abortion, endometritis and infertility. Zentralblatt fur Veterinarmedizin 223(5): 372-380.

Hartigan, P.J. 1977. The role of non-specific uterine infection in the infertility of clinically normal repeat breeder cow. Vet. Sci. Com. 1 : 307-321.

Hussain, A.M., Daniel, R.C.W. and O'Boyle, D. 1990. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. Theriogenology 34(2) : 291-302.

Kay, R.M. 1978. Changed in milk production, fertility and calf mortality associated with retained placenta or birth of twins. Vet. Rec. 102 : 477-479.

Kindahl, H., Frederickson, G., Madej, A. and Edquist, L.E. 1984. Role of prostraglandins in uterine involution. Proc. Xth Int. Cong. Anim. Reprod. and AI., Urbana Champaign, IV : 9-24.

Kirby, W.M.M. and Bauer, A.W. 1966. Standard disc-agar plate method for determining susceptibility to antibiotics. Antibiotic Annual. 45 : 498.

Konerman, H. 1974. Fertility problems in cattle breeding, causes and possible counter measures. Vet. Med. Res. : 32-57.

Kriengsak, P. 1978. Media, Tests and Reagents for Medical Bacteria and Fungi. Faculty of Veterinary Science Chulalongkorn University.(Unpublished Manuscript)

Lowder, M.Q. 1993. Diagnosing and treating bovine postpartum endometritis. Vet. Med. 88 (5) : 474-479.

Markusfeld, O. 1984. Factors responsible for post parturient metritis in dairy cattle. Vet. Rec. 114 (21) : 539-542.

Martinez, J. and Thibier, M.1984a. Reproductive disorders in cattle : I. Respective influence of herds. seasons, milk yield and parity. Theriogenology. 21 : 569-581.

_____. 1984b. Reproductive disorders in cattle : II. Interrelationships between pre or post service infections and functional disorders. Theriogenology. 21:583-590.

Madej, A., Kindahl. H., Woyno, W., Edquist, L.E. and Stubuickel, R. 1984. Blood level of 15-keto-13, 14-dihydro-prostaglandin F2α during the postpartum period in primiparous cow. Theriogenology. 21 : 279-287.

Morrow, D.A. 1969. Postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle. Vet. Scope. XIV : 2-13.

_____. 1986. Current Therapy in Theriogenology. 2nd ed. W.B. Saunders Co.

Messier, S., Higgins, R., Couture, Y. and Merin, M. 1984. Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterine. Can. Vet. J. 25 : 283-288.

Miller, H.V., Kendrick, J.W., Kimsey, P.B. Darien, B., Doering, L., Franti, C. and Horton, J. 1980. Endometritis of dairy cattle : diagnosis, treatment, and fertility. Bovine Practitioner 15 : 13-23.

Minocha, H.C., Marion, G.B., Gier, H.J. and Mc Makon, K.G. 1964. An instrument for obtaining aseptic bacteriologic and histologic samples from the bovine genital tract. Am. J. Vet. Res. 25 (107): 1051-1056.

Montes, A.J. and Pugh, D.G. 1993. Clinical approach to postpartum metritis. The Compendium on Continuing Education. 15(8) : 1131-1137.

Noakes, D.E., Till, S. and Smith, G.R. 1989. Bovine uterine flora postpartum : A comparison of swabbing and biopsy. Vet. Rec. 124(21) : 563-564.

Olson, J.D., Ball, L., Mortimer, R.G., Faren, P.W., Adney, W.S. and Huffman, E.M. 1984. Bacteriology of pyometra in the dairy cow. Proc. Xth Int. Cong. Anim. Reprod. and AI., Urbana-Champaign; IV : 25-32.

Oltenacu, P.A., Britt, J.H., Braun, R.K. and Mellenberger, R.W. 1983. Relationships among type of parturition, type of discharge from genital tract, involution of cervix and subsequent reproductive performance in Holstein cows. J. Dairy Sci. 66 : 612-619.

Patton, R.A., Bucholtz, H.F., Schmidt, M.K. and Hall, F.M. 1988. Body condition scoring-a management tool. Michigan State University.

Peerasak, C., Humbert, J.M., Krit, B. and Samphan, S. 1990. Reproductive disorder control and herd health monitoring programme for improvement of dairy production in Thailand: II Investigation on infecundity. ISBN 974-560-666-9 : 7

Pelissier, C.L. 1976. Dairy cattle breeding problems and their consequences. Theriogenology 6 : 575-583.

Peter, A.T., Bosu, W.T.K. and Gilbert, R.O. 1990. Absorption of Escherichia coli endotoxin (lipopolysaccharide) from the uteri of postpartum dairy cows. Theriogenology 33(5) : 1011-1014.

Richardson, G.F. 1993. Current Veterinary Therapy 3 : Food Animal Practice, 3rd ed. Howard. W.B. Saunders Co.

Roth, J.A., Kaerberle, M.L., Appell, L.H. and Nachreiner, R.F. 1983. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. Am. J. Vet. Res. 44 : 247-253.

Ruder, C.A., Sasser, R.J., Williams, R.J., Ely, J.K., Bull, R.C. and Butler, J.E. 1981. Uterine infections in the postpartum cow. II Possible synergistic effect of Fusobacterium necrophorum and Corynebacterium pyogenes. Theriogenology 15(6) : 573-580.

Sagartz, J.W. and Hardenbrook, H.J. 1971. A clinical, bacteriologic and histologic survey of infertile cows. J.A.V.M.A. 158 (5) : 619-622.

Sandals, W.C.D., Curtiss, R.A., Cote, J.F. and Martin, S. W. 1979. The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle. A case control study. Can. Vet. J. 20 : 131-139.

Scanlan, C.M.1988.Introduction to Veterinary Bacteriology. 1st ed.: Iowa University Press.

Schlutz, J., Van Aert, R., Dekeyser, P. and Vandeplassche, M. 1979. Immunofluoresz enzuntersuchungen zum Nachweis von Antikorpen gegen Corynebacterium pyogenes and Streptokokken in Blutserum and Vaginalschleim von Rindern. Arch. Exp. Vet. Med. 33 : 783-789.

Steffan, J., Agrie, M., Adriamanga, S. and Thibier, M. 1984. Treatment of metritis with antibiotics or prostaglandin F2α and influence of ovarian cyclicity in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 45 : 1090-1094.

Stevenson, J.S. and Call, E.P. 1988. Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. J. Dairy Sci. 71 : 2572-2583.

Studer, E. and Morrow, D.A. 1978. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential : comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. J.A.V.M.A. 172(4) : 489-494

Takacs, T., Gathy, I., Machaty, Z and Bajmocy, E. 1990. Bacterial contamination of the uterus after parturition and its effect on the reproductive performance of cows on large-scale dairy farms. Theriogenology. 33(4) : 851-865.

Wagner, W.C. and Hansel. W. 1969. Reproductive physiology of the postpartum cow. I. Clinical and histological finding. J. Reprod. Fertil. 18 : 493-500.

Whitacre, M.D. 1992. Intrauterine infusion in the postpartum dairy cow. Veterinary Medicine. 87(4) : 376-381.

ภาคผนวก ก

การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Isolation)
(Scanlan, 1988)

1. การย้อมสีแบคทีเรีย (Bacteria stains)

ใช้ Gram stain เป็นการย้อมสีเพื่อแบ่งแยกแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) และแกรมลบ (gram negative) โดยใช้หลักการความแตกต่างของผนังเซลล์แบคทีเรีย ขั้นตอนทั้งหมดมี 4 ขั้นตอน

1.1 ขั้นแรกใช้ crystal violet 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า

1.2 ขั้นสองใช้ Gram's iodine 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า พวกแบคทีเรียแกรมบวก Gram's iodine จะจับตัวกับ crystal violet ที่ผนังเซลล์ทำให้เป็นสีม่วง

1.3 ขั้นสามใช้ 95% แอลกอฮอล์ เพื่อ decolorize crystal violet จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

1.4 ขั้นสี่ใช้ safranin จะย้อมผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้เห็นเป็นสีแดง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacteriologic media)

2.1 อาหาร (Nutrients) ประกอบด้วย

2.1.1 โปรตีน (proteins) ได้แก่ casein, meat infusion, peptones, tryptones เพื่อเป็นแหล่งที่ให้คาร์บอนและไนโตรเจน อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปมีโปรตีนประมาณ 1-2%

2.1.2 คาร์โบไฮเดรท (carbohydrates) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานใช้ในพวก fermentation, oxidation และ differential media ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรทประมาณ 0.5-2%

2.1.3 ไขมัน (lipids) ใช้กับพวก pathogenic leptospires และ mycobacteria

2.1.4 อาหารเสริม (enrichment) ได้แก่พวก เลือด ซีรั่ม ไวตามิน และ yeast extract ใน blood agar จะมี 5% ของ defibrinated sheep หรือ bovine blood

2.2 Agar, buffer และ salts

2.2.1 Agar เป็น gelatinous extract ของ red seaweed ใน plating media ใช้ 1-2% ใน differential motility media ใช้ 0.05-0.4%

2.2.2 Buffer ใช้เพื่อให้ระดับ pH คงที่ สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย และเป็นตัวบอกได้เมื่อแบคทีเรียมี metabolic product pH จะมีการเปลี่ยนแปลง buffer ที่ใช้ได้แก่ monosodium phosphate, disodium phosphate, potassium phosphate.

2.3 pH indicators

จุดประสงค์ของ pH indicators

2.3.1 pH indicators ใช้วัด pH ใน media test ของแบคทีเรียที่มี enzymatic activity แล้วให้สารบางชนิด

1. Bromocresol green ใช้ตรวจดู amino acid catabolism

2. Bromothymol blue ใช้ตรวจ citrate utilization test

3. Litmus ใช้ใน litmus milk broth ซึ่งจะเป็นทั้ง pH indicator และ redox indicator anaerobic bacteria บางชนิดสามารถลด litmus ให้เป็นสีขาว ซึ่งมักจะใช้ในการแยกพวก Clostridium spp.

4. Methyl red ใช้ใน methyl-red-voges proskauer (MRVP) medium

5. Neutral red ใช้ใน MacConkey agar

6. Phenol red ใช้ใน carbohydrate fermentation media

2.3.2 pH indicator บางชนิดจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1. Eosin Y และ methylene blue dyes ใช้ใน eosin methylene blue (EMB) agar ซึ่งเป็นทั้ง selective และ differential medium Eosin Y เป็นทั้ง pH indicator และ selective inhibitor ของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ บางตัวใช้ในการแยกแบคทีเรียพวก enterobacteria

2. Malachite green dye จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนมาก ยกเว้นพวก mycobacteria

2.3.3 pH indicators บางชนิดเป็น redox indicator สำหรับควบคุม anaerobiosis

1. Methylene blue ใช้เป็น redox indicator สำหรับ oxygen free condition ใน anaerobic culture jar และ chamber
2. Resazurin และ phenosafranin ใช้เป็น redox indicator ใน anaerobic bacteriologic culture media

2.4 <u>ตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย</u> (Inhibitors of bacterial growth) มีทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่

1. <u>Antibiotic และ antibacterial drugs</u> ได้แก่ Bacitracin, Carbenicillin, Cephalothin, Chloramphenicol, Colistin, Cycloserine, Gentamicin, Kanamycin, Methicillin, Neomycin, Penicillin, Streptomycin, Sulfonamides, Trimethoprim และ Vancomycin
2. <u>Chemicals</u> ได้แก่ bile salts (sodium deoxycholate, sodium taurocholate) และ phenylalcohol, potassium cyanate, potassium thiocyanate, sodium azide และ sodium selenite

3. Dyes ได้แก่ brilliant green, crystal violet, eosin Y, ethyl violet และ methylene blue

4. Heavy metals ได้แก่ bismuth sulphite cadmium sulphate lithium chloride, potassium tellurite

3) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Agar media)

3.1 Streak method (ภาพที่ 7)

3.2 Nonselective agar media

3.2.1 ใช้ blood agar

การเกิด hemolytic reaction บน blood agar

1. Alpha hemolysis มีความใสที่ไม่ชัดเจนรอบ colony และ media เปลี่ยนเป็นสีเขียว

2. Bata hemolysis มีความใสชัดเจนรอบ colony

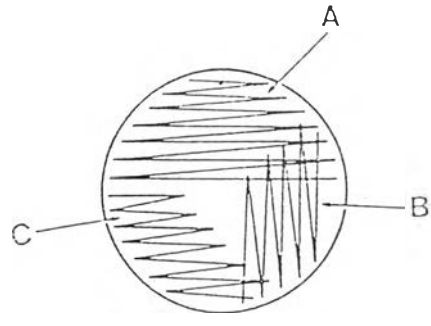
3. Double zone hemolysis มีขอบเขตความใสชัดเจนติดกับ colony และมีความใสที่ไม่ชัดเจนรอบนอกอีกชั้นหนึ่ง

3.3 ลักษณะ colony (ภาพที่ 8)

1. รูปร่าง colony ให้ดูขนาด รูปร่าง การนูน สี ความหนาแน่น และผิวหนังของ colony

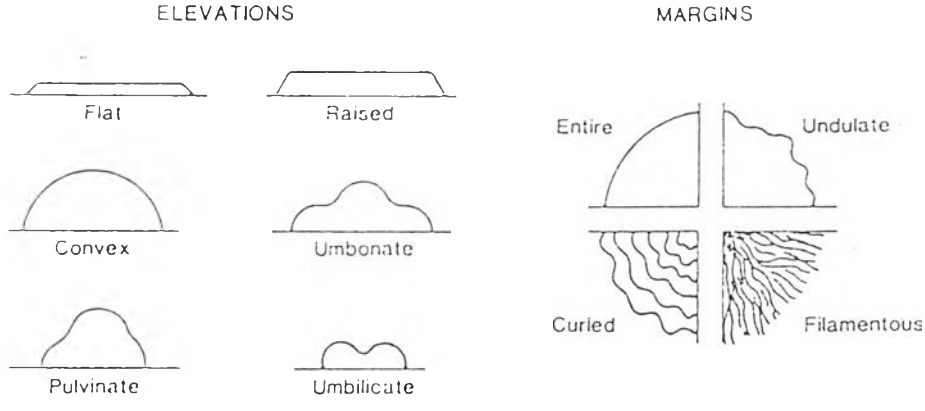
- เส้นผ่าศูนย์กลางวัดเป็นมิลลิเมตร
- การยกนูนของ colony แบ่งเป็นชนิดคือ flat, nuised, convex และ umbonate และขอบของ colony มี 4 ชนิดคือ entire, undulate, filamentous และ curled

ภาพที่ 7 Streak method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
(ที่มา : Scanlan, 1988)



Common streaking method for the isolation of bacteria on agar media showing the primary streak area (*A*), the second streak area (*B*), and the third streak area (*C*).

ภาพที่ 8 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรีย
(ที่มา : Scanlan, 1988)



The morphologic characteristics of bacterial colonies.

- สีของ colony ส่วนใหญ่จะเป็นสีขาว ขุ่นขาว เหลือง แต่อาจจะมีสีส้ม แดง หรือดำ
- ความหนาแน่น อธิบายได้ว่าเป็น opaque, translucent หรือ transparent
- ผิวหน้าของ colony เป็น glisten หรือ dull

3.4 Selective agar media

1. Selective media ใช้สำหรับการเจริญของแบคทีเรียจำเพาะที่ต้องการศึกษา และยับยั้งกลุ่มอื่นที่ไม่ต้องการศึกษา
2. Selective media ใช้ทั่ว ๆ ไป ได้แก่ sodium azide blood agar, brilliant green agar, eosin methylene blue agar, MacConkey agar, mannitol salt agar และ tergitol 7 agar

4. การทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีและการเคลื่อนไหว (Biochemical และ Motility tests) (Kriengsak, 1978)

การทดสอบชีวเคมีที่ใช้ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ได้แก่

4.1 Catalase test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ catalase

Media และ reagent ที่ใช้ : 3% hydrogen per - oxide (H_2O_2) solution

วิธีทดสอบ วิธี slide test ใช้ loop นำ colony จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาแตะลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยด 3% H_2O_2 1-2 หยด

การอ่านผลการทดสอบ

เกิดฟองอากาศ แสดงว่ามี catalase enzyene

ไม่เกิดฟองอากาศ แสดงว่าไม่มี catalase enzyme

4.2 Citrate utilization test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถใช้ citrate เป็นแหล่งของคาร์บอน สำหรับขบวนการเมดาโบลิซึ่มผลทำให้เกิดความเป็นด่าง

Media และ reagent ที่ใช้ Simmon's citrate slant

วิธีทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ streak บน Simmon's citrate slant หลังจากนั้น 7 วัน ตรวจดูการเจริญและสีที่เปลี่ยนแปลง

การอ่านผลการทดสอบ

ถ้ามีการเจริญของแบคทีเรียและเป็นสีฟ้า แสดงว่ามีการใช้ citrate

ถ้าเป็นสีเขียวเหมือนเริ่มทดสอบ แสดงว่าแบคทีเรียไม่ได้ใช้ citrate

4.3 Indol test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่จะผลิต indol จาก amino acid tryptophan

Media และ reagent ใช้ Kovac's reagent และ indol broth

วิธีทดสอบ นำแบคทีเรียจะทดสอบลงใน indol broth Incubate 37°ซ. นาน 24-48 ชม. แล้วหยด Kovac's reagent 3-5 หยด แล้วตรวจดูผล

การอ่านผลการทดสอบ

ในชั้น alcohol สีชมพู แสดงว่ามี indol

ในชั้น alcohol สีเหลืองหรือสีชีดจาง แสดงว่าไม่มี indol

4.4 Triple Sugars Iron (TSI) agar test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถใช้ specific carbohydrates (glucose, lactose และ saccharose) แล้วทำให้เกิดกรด กรดและก๊าซ และ hydrogen sulphite

Media และ reagent ใช้ TSI agar

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่จะทดสอบ streak บน TSI agar slant และ stab ลงในเนื้อ TSI agar butt incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 18-24 ชม.

การอ่านผลการทดสอบ

Slant สีแดง แสดงว่าใช้ glucose ไม่ใช้ lactose และ saccharose

Slant และ butt สีเหลือง แสดงว่าใช้ glucose, lactose และ saccharose

Slant สีแดง butt สีเหลืองและดำ แสดงว่าใช้ glucose ไม่ใช้ lactose และ saccharose และเกิด H_2S

Slant และ butt สีเหลือง และมีก๊าซ แสดงว่าใช้ glucose lactose และ saccharose และผลิตก๊าซ

4.5 Methyl red test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบว่ามีกรดในการเกิด fermentation ของ glucose ทำให้ pH ลดต่ำลง ประมาณ 4.5

Media และ reagent ใช้ Clark และ Lubb's medium (glucose phosphate broth) และ methyl red reagent

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงใน Clark และ Lubb's medium incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24-48 ชม. หยด methyl red reagent 2-3 หยด อ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

สีแดง แสดงว่า เกิดกรด (pH ประมาณ 4.5)

หยด methyl red reagent (pH >4.5)

4.6 Motility test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้หรือไม่

Media และ reagent ใช้ motility test medium (semisolid agar)

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ stab ลง semisolid agar incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24-48 ชม. อ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

พบลักษณะคล้ายแปรงและขุ่นรอบแนว stab แสดงว่าเคลื่อนที่ได้

พบลักษณะเจริญรอบแนว stab แสดงว่าเคลื่อนที่ไม่ได้

4.7 Nitrate reduction test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบเปลี่ยนจาก nitrate เป็น nitrite ได้ free nitrogen

Media และ reagent ใช้ nitrate broth

Solution A (0.8% sulphanilic acid in 5N acetic acid)

Solution B (0.5% alpha naphthylamine in 5N acetic acid)

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงใน nitrate broth incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24-48 ชม. เติม Sol. A และ Sol. B แล้วอ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

สีแดง แสดงว่า nitrate เปลี่ยนเป็น nitrite

สีใส แสดงว่า nitrate ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น nitrite หรือกลายเป็นก๊าซ

เติมผลส้งกะสี อ่านผล

สีใส แสดงว่า nitrate กลายเป็นก๊าซ

สีแดง แสดงว่า nitrate ไม่ถูกเปลี่ยนเป็น nitrite โดยแบคทีเรีย แต่ส้งกะสีเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite

4.8 Oxidase test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิต enzyme oxidase (cytochrome oxidase สามารถย้ายออกซิเจนได้)

Media และ reagent ใช้ 1% aq solution tetramethyl p-phenylenediamine dihydrochloride (oxidase reagent)

การอ่านผลทดสอบ

ถ้าแนวที่ป้ายเชื้อแบคทีเรียเป็นสีม่วงใน 10 วินาที แสดงว่าเกิด oxidase

4.9 Oxidative - fermentative test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถใช้ carbohydrate ในสภาวะที่ไม่มีอ๊อกซิเจน {anaerobic, fermentation หรือสภาวะที่มีอ๊อกซิเจน (oxidation aerobic)}

Media และ reagent ใช้ Hugh and Leifson's medium มี 1% glucose

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ stab ลงใน H and L medium 2 หยด หลอดที่ 1 เปิด หลอดที่ 2 ปิดผิวด้านบน media ด้วย white soft paraffin incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24-72 ชม. อ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

หลอดที่ปิดและเปิดเป็นสีเหลือง แสดงว่าเกิด fermentation

หลอดที่ปิดสีฟ้าหรือเขียว หรือเปิดสีเหลือง แสดงว่า oxidation

หลอดที่ปิดและเปิดสีฟ้าหรือเขียว แสดงว่า ไม่เกิด fermentation หรือ oxidation

4.10 Urease test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถใช้ urea เป็นแหล่งของ nitrogen

Media และ reagent ใช้ urea christiensen's

วิธีการทดสอบ นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ streak ลงบน urea christiensen slant incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24 ชม. อ่านผล

การอ่านผลการทดสอบ

Slant สีชมพู แสดงว่ามี enzyme urease

Slant สีเดิม แสดงว่าไม่มี enzyme urease

4.11 Voges - Proskauer test

หลักการและเหตุผล : ทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิต acetoin หรือ acetylmethyl carbinol จาก glucose phosphate medium

Media และ reagent ใช้ glucose phosphate medium (Chark and Lubb's, MR-VP medium)
40% potassium hydroxide solution
5% alfa-naphthol in absolute alcohol

<u>วิธีการทดสอบ</u> นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงใน MR-VP Medium incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 24-48 ชม. หยด 40% KOH 0.5 มล. กับ 5% alfa-naphtol solution 0.5 มล. เขย่าแล้วเอียงหลอดไว้ 30 นาที อ่านผล

<u>การอ่านผลทดสอบ</u>

ถ้า medium เป็นสีแดง แสดงว่ามี acetoin

ถ้า medium เป็นสีส้มหรือน้ำตาล แสดงว่าไม่มี acetoin

5. <u>การแยกชนิดของแบคทีเรีย</u> (Identification and Classification of bacteria) (Cowan and Steel, 1974)

เมื่อเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียได้บริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเรียบร้อยแล้ว นำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่พบกับตาราง (ภาคผนวก ค)

<u>การทดสอบการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ</u> (Sensitivity testing methods) (Scanlan, 1988)

1. <u>Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests</u>

1.1 <u>Broth dilution method</u>

- MIC คือความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาปฏิชีวนะ ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในหลอดทดสอบ
- วิธีการทดสอบ นำหลอดทดสอบใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ใส่ยาปฏิชีวนะในหลอดทดสอบอัตราส่วนความเข้มข้นมากไม่น้อย และหลอดควบคุมไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ

- นำหลอดทดสอบที่เตรียมไว้ใส่แบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ ใส่ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°ซ. นาน 18 ชม.
- การอ่านผลการทดสอบ

ตรวจดูความขุ่นของหลอดทดสอบ ความเข้มข้นของหลอดทดสอบที่ไม่ขุ่นคือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (MIC) (ภาพที่ 9)

1.2 Microtube broth dilution method

วิธีนี้คล้ายกับ broth dilution method แตกต่างกันที่ใช้ microtube แทนหลอดทดสอบ

2. Kirby - Bauer agar disc diffusion method

วิธีนี้ใช้โดยทั่วไปสำหรับแบคทีเรียที่ต้องใช้อ๊อกซิเจน (aerobic bacteria) มากกว่า มีขั้นตอนดังนี้

2.1 Standardized medium ใช้ Mueller-Hinton agar

2.2 Standardized inoculum

แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบจะเพาะเชื้อใน trypticase soy broth และใส่ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°ซ. จนแบคทีเรียเจริญมีความขุ่นเทียบเท่ากับ Mac Farland มาตรฐานเบอร์ 1 คือความเข้มข้นของแบคทีเรียจะประมาณ 10^8

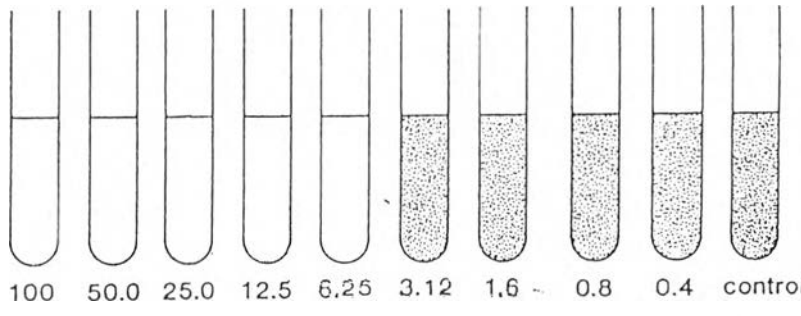
2.3 นำ steriled swab จุ่ม trypticase soy broth ที่มีแบคทีเรียทดสอบมาป้ายบน Mueller-Hinton agar ใน plate

2.4 นำ standardized antibiotic disc มาวางบน Mueller-Hintin agar ที่ป้ายแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบแล้ว

2.5 นำ plate ไปใส่ตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37°ซ. นาน 18 ชม.

2.6 วัด clear zone ที่เกิดรอบ standardized antibiotic disc เพื่อดูว่า susceptible, resistant หรือ intermediate แล้วเทียบกับตารางมาตรฐาน

ภาพที่ 9 การทดสอบการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Broth dilution method
(ที่มา : Scanlan, 1988)



Broth dilution antimicrobial susceptibility of an antibiotic with a minimum inhibitory concentration of 6.25 ug/ml.

ภาคผนวก ข

การให้คะแนนรูปร่าง Body Condition Scoring (BCS)

วัตถุประสงค์ของการทำ BCS

เพื่อประเมินคุณค่าอาหารที่ให้แม่โค โดยดูลักษณะร่างกายของแม่โคที่ตอบสนองต่ออาหารที่ให้ นอกจากใช้ติดตามความต้องการของแม่โคแล้วต้องใช้ BCS ในการเพิ่มอาหาร เพื่อให้แม่โคผลิตน้ำนมได้มากเท่ากับปริมาณที่แม่โคนั้นควรจะผลิตใกล้เคียงกับพันธุกรรมของแม่โคนั้น ๆ

การให้ BCS ทำได้ในระยะต่าง ๆ ของการผลิตเพื่อดูว่าแม่โคนั้นมีการเปลี่ยนแปลงใช้พลังงานส่วนที่สะสมไว้ (ไขมัน) ออกไปมากน้อยเพียงใด และแก้ไขการจัดการด้านอาหารให้แม่โคนั้นมีน้ำนมมากขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์

ทำ BCS เมื่อไร

ยิ่งบ่อยยิ่งดี ควรทำเดือนละครั้ง หรือทุก 2 เดือน ทั้งนี้การให้ BCS ต้องนำไปใช้ (ไม่ใช่นำไปเก็บข้อมูลไว้ซึ่งจะเพิ่มงานมากกว่าปกติ) เพื่อความสะดวกในการประเมินผล ควรทำในระยะต่อไปนี้คือ

1. เมื่อผสมพันธุ์
2. เมื่อสัตวแพทย์ตรวจ เช่น หลังคลอด 30 วัน หรือ 5-6 สัปดาห์หลังคลอด
3. เมื่อฉีดวัคซีนทั้งฝูง
4. เมื่อคลอดลูก
5. ในระยะกลางของการรีดนม (150-200 วันหลังคลอด)
6. เมื่อหยุดรีดนม (dry off)

การให้คะแนนนี้เป็นการประเมินปริมาณไขมันใต้ผิวหนังในโคตำแหน่งที่สังเกตได้แก่ กระดูกสันหลัง กระดูกสะโพก ชี่โครงและแอ่งด้านข้างของช่องท้อง

สภาพโคที่มีไขมันมาก (อ้วน) หรือน้อย (ผอม) จะบ่งถึงการสะสมไขมัน ซึ่งมีผลมาจากอาหารที่ให้เพียงพอ น้อยหรือมากเกินไป โคสาวเมื่อคลอดลูกควรมีระหว่างคะแนน 3.0-3.5 ถ้าอ้วนกว่านี้อาจมีปัญหาเกี่ยวกับคลอด

การให้คะแนน (ระบบอเมริกัน) (Patton และคณะ, 1988)

BCS = 1 จะเห็นกระดูกของสันหลังชัด โดยเฉพาะปีกกระดูกหลังส่วนเอว (lumbar) บริเวณหลังส่วนกล้ามเนื้อสันนอกจะยุบราบเป็นเส้นตรง หรือเว้าเมื่อมองด้านข้าง บริเวณก้น (กระดูก ischium) จะเห็นชัด กล้ามเนื้อก้นยุบลึก แอ่งระหว่างหาง และรูทวารหนักยุบลึกลงไปรูปอักษร "V"

BCS = 2 แอ่งรอบโคนหางและรูทวารหนักมีไขมันพอสมควร รูปอักษร "U" กล้ามเนื้อบริเวณสันนอกยุบ เห็นกระดูกสันหลังชัดเจน ปีกกระดูกสันหลังส่วนเอวคลำได้ชัด

BCS = 3 ไม่มีแอ่งบริเวณโคนหางและรูทวารหนักมีไขมันคลุมบริเวณกระดูกสะโพก มองด้วยตาจะไม่เห็นซี่โครงแต่คลำได้ กล้ามเนื้อสันนอกเป็นเส้นตรง (จากสันหลังไปปีกกระดูกเอว)

BCS = 4 โคอยู่สภาพอ้วนมีไขมันพอกบริเวณโคนหางและรูทวารชัดเจน สะโพกดูกลมมน ไม่เห็นซี่โครงแม้จะกดคลำไม่เด่นชัด แนวสันนอกโค้งนูน

BCS = 5 สภาพโคอ้วนมาก คลำไม่พบกระดูกสะโพก ไขมันพอกบริเวณซี่โครง อ้วนมากจนคลำกระดูกไม่ชัดเจน แนวสันนอกเป็นเส้นตรงกับแนวระดับ

วิธีการให้คะแนน

ให้ยืนด้านหลังของโค สังเกตแอ่งโคนหางและรูทวาหนัก ให้คะแนน (rump) โดยคลำกระดูก ischium (pin) และกระดูกเชิงกราน จากนั้นให้คะแนนส่วนหลัง (loin) โดยใช้มือข้างเดียวกันคลำ

ถ้าคะแนนของก้นและหลังต่างกันมากกว่า 1.0 ให้ลดคะแนนก้นลง 0.5 คะแนน จะเป็นค่า BCS ดังตัวอย่างนี้

Rump score	Loin score	แตกต่าง	ค่าปรับ	BCS
4.0	2.5	1.5	-0.5	3.5
3.0	2.5	0.5	0	3.0

ภาคผนวก ค

ตารางการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย (Table for Bacteriological Identification)*

Symbols used in Chapters 6 and 7 and equivalent descriptive terms

Symbol	Meaning and descriptive equivalent
+	85–100 % strains are positive (all, most, many, usually)
d	16–84 % strains positive (many, some)
–	0–15 % strains positive (no, none, few, some)
( )	Delayed reaction in test or delayed growth
(d)	Different reactions by different strains; positives are delayed
(w)	Reaction delayed and weak
w/–	Different reactions by different strains; positives are weak or growth is feeble
D	Different reactions given by lower taxa (genera, species, varieties)
	Not known

ที่มา : * Cowan, S.T. and Steel, K.J. 1974. Mannual for the identification of medical bacteria., (2^{nd} ed), Cambridge University Press.

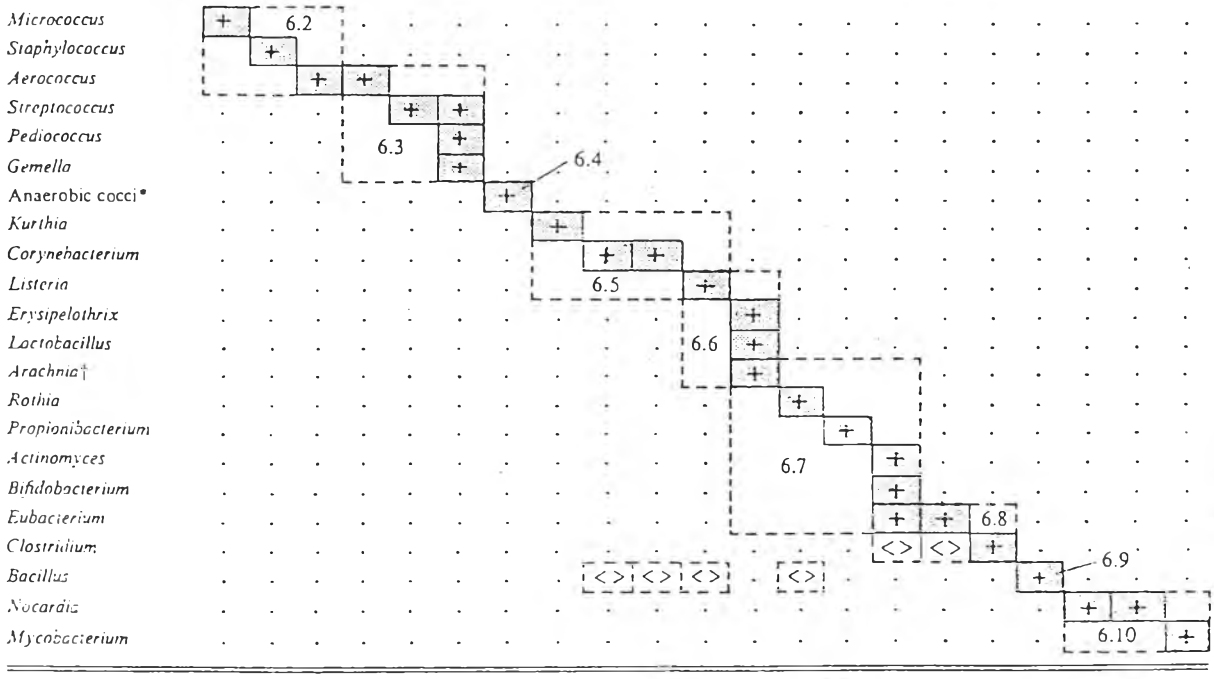
Additional symbols used in some tables of Chapters 6 and 7

Symbol	Meaning
A	Acid produced in milk
B	Acid produced in milk; clotting is irregular
C	Acid clot in milk
c	Rennet (or rennet-like) clot
(C)	Slow formation of acid clot
E	Some strains produce a soft clot
F	Fermentative; fermentation
G	Gas produced
J	Generally positive in young cultures; inconstant in older cultures
M	Digestion of clot in milk
N	Reduction of indicator
NT	Not tested; not testable
O	Oxidative; oxidation
[O]	Under aerobic conditions
[Ø]	Under anaerobic conditions
R	Rod-shaped
r	Resistant (to antibiotic, etc.)
S	Sphere; coccus
s	Susceptible; sensitive to antibiotic, etc.
T	Spores terminal
U	Spores central
V	Spores subterminal; variable in position
X	Spores oval; ellipsoidal
(x)	Late and inconstantly positive (mutative)
Y	Spores round

Letters in bold type are serological designations
Superior italic letters are explained in footnotes to the individual table

First-stage table for Gram-positive bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Shape	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Acid fast	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	w	+
Spores	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−
Motility	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	D	D	−	−	−
Growth in air	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+
Growth anaerobically	−	+	w	w	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	D	−	−	×
Catalase	+	+	w	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	+	+	+	+
Oxidase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	×	×	×	×	×	d	−	−	−
Glucose (acid)	D	+	+	+	+	+	+/−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	D	D	+	+	+
OF	O/−	F	F	F	F	F	F/−	−	−	F	F	F	F	F	F	−	F/−	F/O/−	O	O	O/NT



* *Peptococcus, Peptostreptococcus* (also *Leuconostoc*).

† Also *Actinomyces odontolyticus*.

D Different reactions in different species of the genus.

d Different reactions in different strains.

F Fermentation.

O Oxidation.

w Weak reaction.

× Not known.

<> Asporogenous variants.

Typical form.

Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.

S Sphere (coccus)

R Rod-shaped (bacillus).

NT Not testable.

. *Second-stage table for* Staphylococcus, Micrococcus *and* Aerococcus

	1	2	3
Growth under anaerobic conditions	+	−	w
Catalase	+	+	w
Oxidase	−	d	−
Carbohydrate attack	F	O/-	F
VP	+	−	−
Nitrate reduced	+	d	−
Arginine hydrolysis	+	−	−
Phosphatase	+	−	.
G+C mole per cent	30–40	66–75	38–43
Lysozyme	r	s	.
Lysostaphin	s	r	.

1 Staphylococcus
2 Micrococcus
3 Aerococcus

r resistant
s sensitive
w weak reaction/growth

Third-stage table for Staphylococcus, Micrococcus *and* Aerococcus

	1	2	3	4	5	6
Growth under anaerobic conditions	+	w	−	−	−	w
Oxidase	−	−	d	−[a]	−[a]	−
Carbohydrate breakdown [F/O/−]	F	F	−/O[b]	O	O/−	F
Carbohydrates, acid from:						
glucose	+	+	−[b]	+	+	+
lactose	+	d	−	d	−	+
maltose	+	+	−	d	−	+
mannitol	+	d	−	d	−	d
mannitol (anaerobic)	+	−	−	−	−	
sucrose	+	+	−	d	d	+
xylose	−	−	−	d	−	−
VP	+	d	−	−	−	−
Nitrate reduced	+	d	−	d	+	−
Gelatin liquefaction	+	d	d	d	−	−
Urease	+	d	d	+	d	−
Arginine hydrolysis	+	+	−	−	−	−
LV (egg-yolk reaction)	+	+	−	−	−	−
Pigment formation[c]	+/−	−/+	+	+	+	−
Phosphatase	+	d	−	−	−	
Coagulase	+	−	−	−	−	−

1 Staphylococcus aureus; *S. pyogenes*; *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*
2 Staphylococcus epidermidis; *S. saprophyticus*; *S. albus*; *Micrococcus pyogenes* var. *albus*
3 Micrococcus luteus; *M. afermentans*; *M. lysodeikticus*; *Staphylococcus afermentans*
4 Micrococcus varians; *M. lactis*; *Staphylococcus lactis*
5 Micrococcus roseus; *Staphylococcus roseus*
6 Aerococcus viridans

[a] Result may vary with the method; see Steel (1962*b*).
[b] May be positive on ammonium salt sugars; see Section 6.2.2.
[c] Pigments usually gold, cream or yellow; *M. roseus* pigment is pink. − on the pigment line = white or grey.

Second-stage table for
Corynebacterium, Listeria *and* Kurthia

	1	2	3
Motility	−	+	+
Catalase	D	+	+
Carbohydrate attack	F/−	F	−
VP	−	+	−
H_2S	−	−	d

1 Corynebacterium
2 Listeria; *Listerella*
3 Kurthia

Third-stage table for Corynebacterium, Listeria *and* Kurthia

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Motility	±	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	±	±
Catalase	±	±	±	−	±	±	±	−	±	±	−	−	±	−	±
Metachromatic granules	−	D	−	−[a]	+	±	−		−	d	d	d	−	−	−
Haemolysis	−	D	±	−	−	d	d	−	−	±	±	±	±	−	−
Growth improved by blood/serum	−	±	±	±	±	±	±	±[b]	±	±	±	−[b]	±		+
Carbohydrate breakdown (F/O/−)	−	F	F	F	F	F	F	?[c]	−	F	F	F	F	F	F
Carbohydrates, acid from:															
glucose	−	±	±	±	+	±	+	−[c]	−	+	+	+	±	±	±
lactose	−	−	−	−	−	d	d	−	−	+	±	−	(d)	±	+
maltose	−	+	+	±	+	d	+	−[c]	−	+	+	+	±	+	+
mannitol	−	−	−	−	−	−	−		−	−	−	−	−	+	±
salicin	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
starch	−	D	+	−	+	d	+	−	−	d	±	+	(d)	+	+
sucrose	−	−	−	+	+	−	d	−	−	+	d	d	(d)	−	−
trehalose	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
xylose	−	−	−	−			−			−	+	d	−	−	−
VP	−	−	−	−	−	−	−	−[c]	−	−	−	−	±	±	±
Aesculin hydrolysis									−				+	+	+
Nitrate reduced	−	+	−	±	+	±	d	−[c]	+	−	−	−	−	−	−
Gelatin liquefaction	D	−	+	−	−	−	d	−	−	+	±	−	−	−	−
Urease	d	−	+	−	d	±	+	−[c]	+	−	−	−	−		
Arginine hydrolysis	−	−	−	−	−	±	+	−	−			−	−	−	

1 Kurthia spp.
2 Corynebacterium diphtheriae
3 Corynebacterium ulcerans
4 Corynebacterium xerosis
5 Corynebacterium murium; *C. pseudotuberculosis-murium*; *C. kutscheri*
6 Corynebacterium renale
7 Corynebacterium ovis; *C. pseudotuberculosis-ovis*; Preisz-Nocard bacillus
8 Corynebacterium bovis
9 Corynebacterium hofmannii; *C. pseudodiphtheriticum* (and variant spellings of both specific epithets)
10 Corynebacterium haemolyticum
11 Corynebacterium pyogenes
12 Corynebacterium vaginale; *Haemophilus vaginalis*
13 Listeria monocytogenes; *Listerella monocytogenes*
14 Listeria grayi
15 Listeria murrayi

[a] ± indicates few granules.
[b] Needs blood but not X/V factors (Dunkelberg & McVeigh, 1969).
[c] Positive when Tween 80 added to medium (see p. 60).
D Different results in the varieties (gravis, mitis, and intermediate) of *C. diphtheriae*.

Second-stage table for Bacillus

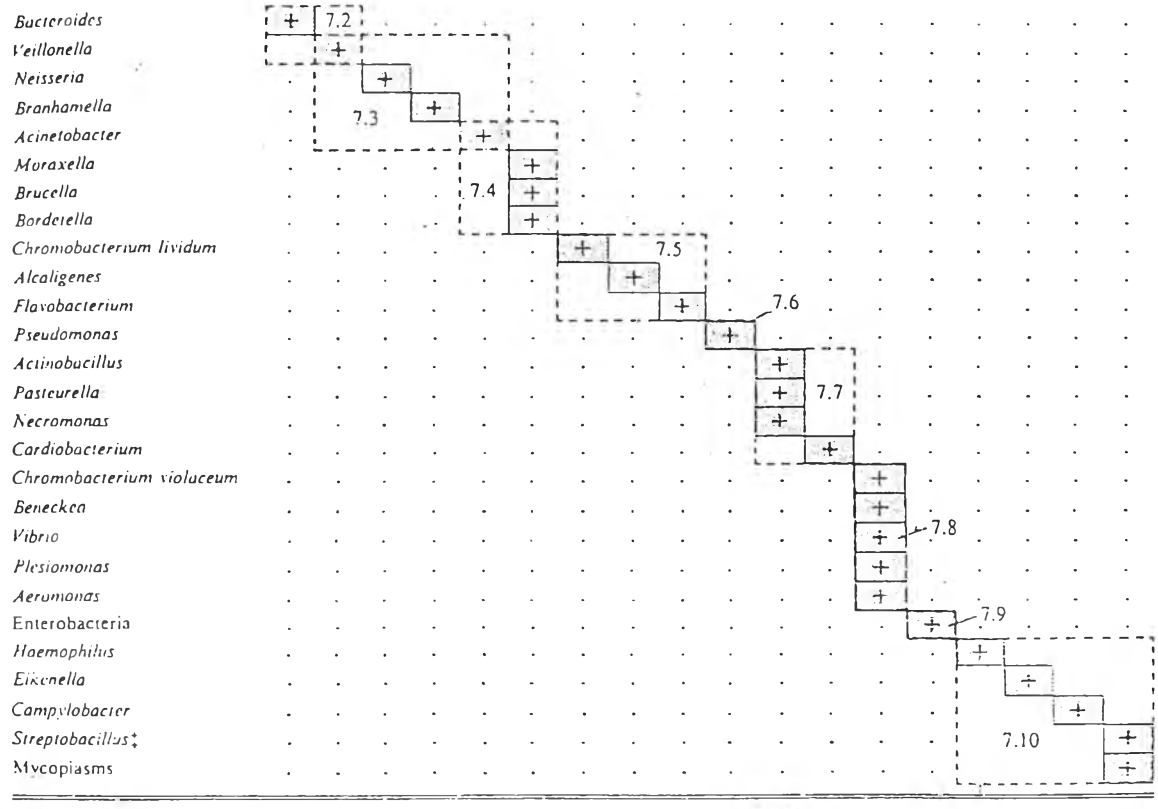
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
Motility[a]	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphological group (see text)	1	1	1	1	1	1	1	1/2	2/3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Spore shape	X	X	X	X	X	X	X	X	XY	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y
Spore position	U	U	U	U	U	U	U	UVT	T	UVT	UVT	UVT	U	T	UVT	T	T	T	T
Swelling of bacillary body	−	−	−	−	−	−	−	d	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
Growth at 45 °C	−	d	d	+	d	+	+	+	+	d	d	d	d	d	−	+	+	+	d
Growth at 65 °C	−	−	−	−	−	−	−	d[b]	−	−	−	−	−	−	−	+	w	+	−
Growth at pH 5.7	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	d	d	−	+	+	.	.	−	d
Growth in 7 % NaCl	+	d	+	+	+	+	+	−	+	−	−	d	−	−	−	−[c]	d	−[c]	d[e]
Utilization of citrate	d	+	−	+	+	+	+	d	−	−	d	−	−	−	−	.	.	−	d
Anaerobic growth in glucose broth	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	d	+	+	+	−	−	+	−
Carbohydrates, acid from:																			
glucose	+	+	w	+[f]	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+[f]	+[f]	+	+	+	−
arabinose	−	−	d	+	d	+	+	d	−	−	−	+	−	+	+	d	−	−	−
mannitol	−	−	+	+	d	+	+	d	−	−	d	+	+	+	+	d	+	−	−
xylose	−	−	d	+	d	+	+	d	−	−	−	+	−	+	+	d	+	−	−
VP test	+	+	−	+	−	+	+	d	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−
Nitrate reduction	+	+	+	+	d	−	+[g]	d	d	−	d	d	+	+	+	+[h]	−	d	−
Indole	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	d	−	−	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	d	−	d	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	d	+	−	+	−	−	d	d
Urease	−	d	−	d	d	−	d	−	−	−	−	−	−	−	−	.	.	.	d
LV	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	.	.	d	.
Lysozyme sensitivity	r	r	s	d	s	d	d	s	s	r	d	d	r	s	d	.	.	s	d

1 Bacillus anthracis
2 Bacillus cereus; *B. anthracoides*
3 Bacillus firmus
4 Bacillus licheniformis
5 Bacillus megaterium
6 Bacillus pumilus
7 Bacillus subtilis
8 Bacillus coagulans
9 Bacillus pantothenticus
10 Bacillus alvei
11 Bacillus brevis
12 Bacillus circulans
13 Bacillus laterosporus
14 Bacillus macerans
15 Bacillus polymyxa
16 Bacillus sp. Wolf & Barker group I
17 Bacillus sp. Wolf & Barker group II
18 Bacillus stearothermophilus; Wolf & Barker group III
19 Bacillus sphaericus

[a] All species may produce non-motile variants.
[b] Some strains grow at 65 °C at pH 6.2 (Wolf & Barker).
[c] Negative in 3 % NaCl.
[d] Positive in 3 %; unknown 7 %.
[e] Positive in 5 %; unknown 7 %.
[f] Gas may be produced on suitable medium.
[g] Often negative in strains that have survived severe heating.
[h] Under anaerobic conditions reduced to nitrogen gas.
J positive in young cultures; inconstant in older cultures.
r resistant.
s sensitive.
T terminal spore.
U central spore.
V subterminal spore.
X spore oval.
Y spore round.

First-stage table for Gram-negative bacteria

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Shape	R	S	S	S	S/R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Motility	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	D	−	−	+	−
Growth in air	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	−*	−†	+
Growth anaerobically	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	±	+	+	−	+
Catalase	d	D	+	+	+	+	+	+	±	+	+	−	+	+	D	−	D	−
Oxidase	−	×	±	±	−	±	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−
Glucose (acid)	D	−	±	−	+	−	+	−	+	±	+	+	+	+	D	−	−	+
Carbohydrates [F/O/−]	F/−	−	O	−	O	−	O	−	O	O	F	F	F	F	NT	−	−	F



* No growth in air; growth in air + CO_2.

† No growth in air or anaerobically; growth in 5–6% O_2.

‡ Also *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga's bacillus).

Typical form.

× Not known.

Cultural characters of these organisms can be found in tables with the number indicated.

NT Not testable by usual methods. Fermentative (Sneath & Johnson, 1973).

Second-stage table for Neisseria, Branhamella, Veillonella, Gemella *and* Acinetobacter anitratus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gram reaction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	±[a]	−	−
Growth under anaerobic conditions	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	w	−	−
Catalase	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	−	D	−
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−		−
Carbohydrate breakdown [F;O/−]	O	O	?	O	O		−	−	−	−	F	−	O
Pigment	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Haemolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	α	β	β	−	−/β
Growth at 22 °C	−	−	+	+	+	(+)	+	w	w	w	+	w	+
Growth on nutrient agar	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+
Requirement for blood or serum	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Carbohydrates, acid from:													
glucose	+	+	−[b]	+	+	d	−	−	−	−	+	−[c]	+
lactose	−	−	−	−	(+)	−	−	−	−	−	−		+
maltose	−	+	−[b]	+	−	−	−	−	−	−	+		d
sucrose	−	−	−[b]	d	−	(+)	−	−	−	−	+	−	−
Nitrates reduced	−	−	−	−	+	+	−	d	+	+	−	+	−

1 Neisseria gonorrhoeae; gonococcus
2 Neisseria meningitidis; *N. intracellularis*; meningococcus
3 Neisseria flavescens
4 Neisseria pharyngis; *N. flava*; *N. perflava*; *N. subflava*; *N. sicca*
5 Neisseria mucosa; *Diplococcus mucosus*
6 Neisseria animalis
7 Neisseria elongata
8 Branhamella catarrhalis; *Neisseria catarrhalis*
9 Branhamella caviae; *Neisseria caviae*
10 Branhamella ovis; *Neisseria ovis*
11 Gemella haemolysans; *Neisseria haemolysans*
12 Veillonella spp.
13 Acinetobacter anitratus

[a] Gram positive but easily decolorized.

[b] Negative on isolation; after some time in artificial cultivation may be positive.

[c] May be positive in some media.

Second-stage table for Pseudomonas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Motility[1]	−	−[2]	+[3]	−	−	−	−	−	−	−
Oxidase	−	−	−	−	−	d	−	−	d	−
PHB accumulation in cells	−	−	−	−	+[4]	−	−	+	+	−
Pigment	−[5]	−[6]		−	d[7]	−		−[8]	−	−
Fluorescence in u.v. light	−	−	+	−	−	−	−	−	−	
Growth at 5 °C	−	−	d	−	−	−	d	−	−	
Growth at 42 °C	−	−	−	−	d	−	d	+	−	
Growth on MacConkey	−	−	+	+	+	+	+	+	−	
Growth in KCN	−	d	−		−	+	−	+	d	
Utilization of citrate as C source	−	−	−	−	+	−[9]	+	+	−	+
Carbohydrates[10] acid from:										
glucose	−	−	+	−	+	(+)[11]	+	+	+	−
lactose	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
maltose	−	−	d	−	−	+	d	+	d	−
mannitol	−	−	d	−	+	−	d	−	+	−
salicin	−	−			+	−	−[12]	−	−	−
sucrose	−	d	−	−	−	−	−	+	d	−
xylose	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+
Starch hydrolysis	−	−	−	−	−	−	+	d	−	−
Nitrate reduced to nitrite	−	d	d	−	d	+[13]	+	+	+	+
Nitrite reduced to N gas	d	−	−	−	−	−	+	d	−	+
Gelatin hydrolysis	−	+	−	+	+	+	−	+	d	−
Casein hydrolysis	−	−	−	+	+	+	−	+		
Urease	−	d	d	−	+	−	(d)	d	d	
Arginine dihydrolase	−	−	+	−	−	−	d	+	+	−
Lysine decarboxylase	−	−	−	−	+[14]	+	−	−	−	
Ornithine decarboxylase	−	−	−	−	d	−	−	−	−	
Egg-yolk reaction	−	d	−	−	+	−	+	+	d	−
Tween 80 hydrolysis	−	d	−	−	+	−	+	+	d	+

1 Pseudomonas aeruginosa: *P. pyocyanea*
2 Pseudomonas fluorescens
3 Pseudomonas putida
4 Pseudomonas diminuta
5 Pseudomonas cepacia: *P. multivorans*; *P. kingii*
6 Pseudomonas maltophilia
7 Pseudomonas stutzeri
8 Pseudomonas pseudomallei: *Loefferella pseudomallei*; *L. whitmori*; *Pfeifferella whitmori*; *Malleomyces pseudomallei*
9 Pseudomonas mallei: *Loefferella mallei*; *Pfeifferella mallei*; *Malleomyces mallei*
10 Pseudomonas pickettii

PHB: Poly-β-hydroxybutyrate.
[1] Pyocyanin.
[2] Fluorescein.
[3] Yellow.
[4] Positive on Kligler's iron agar and TSI.
[5] Positive on Christensen's citrate medium and in BSS tests.
[6] Hugh & Leifson base (A 2.6.1) + 1 % sugar; ASS sugars (Section A 2.6.5).
[7] Weak on H & L medium; negative on ASS.
[8] Cannot use nitrate as N source.
[9] Positive by Richard's method; d by Moller's method.

Buffered single substrate (BSS) tests
(Pickett & Pedersen, 1970*b*, *c*)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Acid from:								
glucose	+	+	+	−	+	+	+	+
fructose	+	+	+	−	+	+	+	+
lactose	−	d	−	−	+	+	−	+
maltose	−	+	−	−	+	+	+	+
mannitol	+	d	−	−	+	−	d	+
salicin	−	−	−	−	+	d	−	+
sucrose	−	d	−	−	d	+	−	−
xylose	+	+	+	−	+	d	+	+

1 Pseudomonas aeruginosa
2 Pseudomonas fluorescens
3 Pseudomonas putida
4 Pseudomonas diminuta
5 Pseudomonas cepacia
6 Pseudomonas maltophilia
7 Pseudomonas stutzeri
8 Pseudomonas pseudomallei

Second-stage table for differentiation of the enterobacteria (majority reactions)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Motility	D	+	D	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
Growth in KCN medium	−	−	−	−	D	−	−	+	+	+	+	+	D	+
Citrate as C source	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	d
Gas from glucose	D	+	−	−	+	D	−	+	D	+	d	+	D	D
MR test	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	d	−	D	+
VP test	−	−	−	−	−	−	d	−	d	+	+	+	D	−
Indole	+	+	−	d	D	−	−	+	D	−	−	−	D	−
Gelatin	−	−	−	−	−	D	+	−	D	−	+	(d)	D	−
Urease	−	−	D	−	D	−	−	+	D	−	d	d	+	d
Phenylalanine	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
H_2S from TSI	−	+	−	−	D	+		−	D	−	−	−	−	−
Lysine decarboxylase	+	+	−	−	−	+	−	−	−	+	d	D	+	d
Ornithine decarboxylase	d	+	D	D	d	D	−	+	D	+	D	+	−	−
Details in Table			7.9*b*					7.9*d*				7.9*e*		

1 Escherichia coli; A–D group
2 Edwardsiella tarda; Asakusa biotype; Bartholomew group
3 Yersinia spp.
4 Shigella spp.
5 Citrobacter spp.: *Levinea* spp.
6 Salmonella spp. and serotypes
7 Erwinia herbicola
8 Morganella morganii; *Proteus morganii*
9 Proteus spp. (including Providence group)
10 Hafnia alvei
11 Serratia spp.
12 Enterobacter spp.
13 Klebsiella aerogenes; K. atlantae; K. edwardsii; K. oxytoca; K. pneumoniae
14 Klebsiella ozaenae; K. rhinoscleromatis

Third-stage table for the enterobacteria (part 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Motility	d	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Catalase	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−
Growth in KCN medium	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Growth on 4 % selenite	+	−	+	−	−	d	−	−	−	.	+	−	−	.	.
Citrate as C source	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Malonate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	d
Carbohydrates:															
gas from glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	d	−	−	−	−	+
acid from:															
adonitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	d
arabinose	+	+	−	+	+	+	−	d	−	d	−	−	+	−	−
dulcitol	d	d	−	−	−	−	−	−	−	(d)	−	−	d	d	d
lactose	−	d	−	−	−	−	−	−	−	−	−	(+)	(d)	(d)	−
maltose	+	+	+	+	+	+	−	d	d	d	d	−	+	+	.
mannitol	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+
rhamnose	d	d	−	(+)	+	−	−	d	−	−	−	d	+	+	+
salicin	d	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	d	+	+
sorbitol	d	d	−	−	−	+	−	d	d	d	d	−	+	+	+
sucrose	d	d	−	−	−	+	−	−	−	−	−	(+)	d	d	−
trehalose	+	.	−	+	+	+	+	+	d	(+)	+	+	+	+	.
xylose	d	d	−	+	+	(+)	−	−	−	−	−	−	+	+	.
ONPG	+	d	−	+	+	+	+	d	−	−	−	+	+	+	.
Aesculin hydrolysis	d	.	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Indole	+	+	+	−	−	d	−	d	d	−	d	−	−	+	−
Urease	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	w	+
H_2S from TSI	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Arginine dihydrolase	d	d	−	−	−	−	−	−	−	d	d	−	d	d	+
Lysine decarboxylase	+	d	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Ornithine decarboxylase	d	d	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	d	+	+

1 Escherichia coli
2 A–D group; Alkalescens–dispar group; Escherichia group
3 Edwardsiella tarda; Asakusa group; Bartholomew group
4 Yersinia pestis; *Pasteurella pestis*; the plague bacillus
5 Yersinia pseudotuberculosis; *Pasteurella pseudotuberculosis*; *P. rodentium*
6 Yersinia enterocolitica; Pasteurella X
7 Shigella dysenteriae (serotype) 1; *Shigella shigae*; Shiga's bacillus
8 Shigella dysenteriae 2–10; (2 = *S. schmitzii*; *S. ambigua*; Schmitz's bacillus); Large–Sach's group
9 Shigella flexneri (serotypes) 1–5; Flexner dysentery bacilli
10 Shigella flexneri 6; Boyd 88; Newcastle bacillus; Manchester bacillus (see Table 7.9c)
11 Shigella boydii (serotypes) 1–15; Boyd's dysentery bacilli
12 Shigella sonnei
13 Citrobacter freundii; *Escherichia freundii*; *Salmonella coli*; *S. hallerup*; *S. hormaechei*; Bethesda–Ballerup group
14 Citrobacter koseri; *C. diversus*
15 Levinea spp.

ZONE DIAMETER INTERPRETIVE STANDARDS

Antimicrobial Agent		Disk Potency	Zone Diameter (mm)			Approximate MIC Correlates	
			Resistant	*Intermediate*	*Susceptible*	*Resistant*	*Susceptible*
Amikacin		30µg	≤14	15-16	≥17	>16µg/ml	≤8 µg/ml
Ampicillin	Enterobacteriaceae & Enterococci	10 µg	≤11	12-13	≥14 ≥29	≥32 µg/ml	≤8 µg/ml
	Staph/Pen susc. orgs	10 µg	≤20	21-28		≥2.0 µg/ml penicillinase	≤0.2 µg/ml
	Haemophilus	10 µg	≤19	–	≥20	–	≤2.0 µg/ml
Carbenicillin	*Proteus & E. Coli*	100 µg	≤17	18-22	≥23	≥32 µg/ml	≤16 µg/ml
	P. aeruginosa	100 µg	≤11	12-14	≥13	≥250 µg/ml	≤125 µg/ml
Cephalothin		30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32 µg/ml	≤10 µg/ml
Chloramphenicol		30 µg	≤12	13-17	≥18	≥25 µg/ml	≤12.5 µg/ml
Clindamycin		2 µg	≤14	15-16	≥17	≥2 µg/ml	≤1 µg/ml
Colistin		10 µg	≤8	9-10	≥11	–	–
Enrofloxacin		5 µg	<16	16-20	≤20	–	–
Erythromycin		15 µg	≤13	14-17	≥18	≥8 µg/ml	≤2 µg/ml
Gentamicin		10 µg	≤12	13-14	≥15	≥6 µg/ml	≤6 µg/ml
Kanamycin		30 µg	≤13	14-17	≥18	≥25 µg/ml	≤6 µg/ml
Methicillin		5 µg	≤9	10-13	≥14	–	≤3 µg/ml
Nafcillin		1 µg	≤10	11-12	≥13	–	≤3 µg/ml
Nalidixic acid		30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32 µg/ml	≤12 µg/ml
Neomycin		30 µg	≤12	13-16	≥17	–	≤10 µg/ml
Nitrofurantoin		300 µg	≤14	15-16	≥17	≥100 µg/ml	≤25 µg/ml
Penicillin G	Staphylococci	10 units	≤20	21-28	≥29	penicillinase	≤0.1 µg/ml
	Other organisms	10 units	≤11	12-21	≥22	≥32 µg/ml	≤1.5 µg/ml
Polymyxin B		300 units	≤8	9-11	≥12	≥50 units/ml	
Streptomycin		10 µg	≤11	12-14	≥15	≥15 µg/ml	≤6 µg/ml
Sulfonamides	*N. mening.* only	250/300 µg			≥40		
	Other organisms	250/300 µg	≤12	13-16	≥17	≥350 µg/ml	≤100 µg/ml
Tetracycline		30 µg	≤14	15-18	≥19	≥12 µg/ml	≤4 µg/ml
Tobramycin		10 µg	≤12	13-14	≥15	≥6 µg/ml	≤6 µg/ml
Trimethoprim-sulfamethoxazole		1.25 µg/23.75 µg	≤10	11-15	≥16	≥200 µg/ml	≤35 µg/ml
Vancomycin		30 µg	≤9	10-11	≥12	–	≤5 µg/ml

ภาคผนวก ง

อาหารเพาะเชื้อแบคทีเรียและน้ำยาทดสอบ (Media and Reagent for Medical Bacteria)*

Media

1. Beef Extract Agar

Beef extract broth	1,000	ml
Agar (bacto agar)	20	g
Final pH 7.2		

Dissolve the agar by hot beef extract broth, adjust pH 7.2, sterilized at 121°C, for 15 min.

2. Blood Agar Plate for Streaking

Beef extract agar	1,000	ml
Defibrinated blood	200	ml
(Calf, Sheep or Human)		

The defibrinated blood may be substitute by citrated blood, Cowan & Steel has been described the strain of Staphylococci may be inhibited by citrate.

ที่มา : * Kriengsak Poonsuk. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

3. Citrate Utilization Medium

a. Citrate, Christiensen's (1940)

Sodium citrate	3 g
Glucose	0.2 g
Yeast extract	0.5 g
Cystine hydrochloride	0.1 g
Ferric ammonium citrate	0.4 g
KH_2PO_4	1 g
NaCl	5 g
$Na_2S_2O_3$	0.08 g
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml
Phenol red, 0.2% sol.	6 ml

Final pH 6.8-6.9

Dissolve the solid by heating, adjust pH, and sterilize at 115°C, for 20 min. This medium also suitable to demonstrate H_2S production; if it is not to be used for this purpose the Cystine, $Na_2S_2O_3$ and Ferric ammonium citrate should be omitted.

b. Citrate, Koser's (1923)

NaCl	5 g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2 g
$NH_4H_2PO_4$	1 g
K_2HPO_4	1 g
Distilled water	1,000 ml

Dissolve the salt in water then added;

Citric acid	2 g

Final pH 6.8

Sterilize at 115°C for 20 min.

c. Citrate Simmon's (1926)

This is modified Citrate Koser's above, incorporating 0.008% Bromthymol blue (40 ml of 0.2% sol.), and gelly by 2% agar.

4. Hugh & Leifson's, O/F Medium

Peptone	2 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	0.3 g
Agar	3 g
Distilled water	1,000 ml
Bromthymol blue, 0.2% sol.	15 ml

Final pH 7.1

Dissolve the ingredients in hot water, adjust pH 7.1, and add indicator sterilize at 115°C for 20 min. Cool add sterile serum and sterile glucose (1% concentration). Dispense in sterile test tubes.

The medium is used for Oxidative and Fermentative test of bacteria and also examine of motility.

5. Indol Broth

Peptone	10	g
NaCl	5	g
Distilled water	1,000	ml

Final pH 8.0

Dissolve the ingredients in hot water, adjust pH 8.0 sterilize at 115°C for 20 min

6. MacConkey Agar

Peptone	20	g
NaCl	5	g
Sodium thiocholate	5	g
Distilled water	1,000	ml

Dissolve the ingredients in hot water, and boil for 20 min. Cool, and filtered.

Lactose	10	g
Agar	20	g
Neutral red, I% aq. sol.	10	ml

Final pH 7.4

Add and dissolve the agar by boiling adjust pH 7.4, sterilize at 115°C for 20 min.

7. MR-VP Medium

See : Glucose phosphate medium (Clark and Lubbs) No. 33

8. Mueller-Hinton Agar

Beef infusion from	300	g
Peptone	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17	g
Distilled water	1,000	ml

Final pH 7.4

Dissolve the ingredients in hot water, boil for 1 min. Sterilize at 121°C for 15 min.

The medium is used for paper disc diffusion method for antibiotic susceptibility of microorganisms. Five percent of the animal blood may be added if the test organisms are fastidious, and chocolatized in the testing of the Haemophilus spp.

9. Nitrite Broth

$NaNO_2$	0.01	g
Meat extract broth	1,000	ml

Dissolve the $NaNO_2$ in broth, sterilize at 115°C for 20 min.

10. Oxidative-Fermentative Medium

See : Hugh & Leifson's Medium

11. Triple Sugars Iron Agar, TSI

Peptone	20	g
Sodium chloride	5	g
Lactose	10	g
Sucrose	10	g
Glucose	1	g
Ferrous ammonium sulphate	0.2	g
Sodium thiosulphate	0.2	g
Phenol red	0.025	g
Agar	13	g
Distilled water	1,000	ml

Final pH 7.3

Mix, and heat to dissolve the ingredients, adjust pH 7.3 and sterilize at 115°C for 20 min.

The medium is used to determining carbohydrates fermentation and hydrogen sulfide production.

12. Urea Medium, SSR

KH_2PO_4	9.1	g
Na_2HPO_4	9.5	g
Yeast extract	0.1	g
Urea	20	g
Phenol red, 0.2% aq. sol.	5	ml
Distilled water	1,000	ml

Final pH 6.8

Dissolve the suspension by heating, add urea adjust pH 6.8 and add indicator, sterilize by filtration.

Reagent

1. Kovac's Reagent

p-dimethylaminobenzaldehyde	5	g
Amyl alcohol	75	ml
Conc. HCl	25	ml

Dissolve the aldehyde in alcohol by gently warming in water bath (about 50-55°C). Cool and add the acid, protect from light and store at 4°C.

2. Hydrogen Peroxide

H_2O_2 3% aq. solution (10 volume)

3. Methyl red Solution

Methyl red		0.04	g
Absolute ethanol		40	ml
Distilled water	to	100	ml

Dissolve the methyl red in the ethanol and dilute to volume with water.

4. Alpha-Naphthol Solution

5% alpha-naphthol in absolute ethanol
(not 95% ethanol)

5. Nitrate Test Reagents

Solution A :

0.8% sulphanilic acid in 5 N acetic acid

Solution B :

0.5% alpha-naphthylamine in 5 N acetic acid

Zinc dust or suspension of zinc dust in 1% methyl cellulose.

6. Oxidase Reagent

1% aq. sol. of tetramethyl-p-phenerlene diamine dihydrochloride

7. Potassium Hydroxide for V-P Test

40% aq. sol. of potassium hydroxide

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายสาโรช งามขำ เกิดวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2504 ที่อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษา ปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2527 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2534 ปัจจุบันรับราชการตำแหน่งนายสัตวแพทย์ 6 ศูนย์วิจัยการผสมเทียมราชบุรี กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์