

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Brucella sheep blood agar (BSA)

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Campylobacter* spp.

1. ผสม Brucella agar base 45 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ Agar ละลายในหม้อนึ่งไอน้ำ หรือตู้ Microwave
2. Sterile ใน Autoclave 121 °C (15 ปอนด์) 15 นาที
3. ลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 50 °C เติม Defibrinated Sterile sheep blood 50 ml. โดยวิธีปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันเทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้แข็งตัวที่ อุณหภูมิห้อง เก็บใส่ถุงพลาสติก เก็บที่ 4-8 °C
 - + Plate ขนาด 9 cm. เท 18 ml. สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ
 - เท 25 ml. สำหรับการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะ

Charcoal Ceferperazone Deoxyhydrate Agar (CCDA)

ใช้เป็น Selective media สำหรับ *Campylobacter* SPP.

1. ละลายผง CCD Blood free selective agar 22.75 gm ในน้ำกลั่น Sterile 500 ml. ต้มให้ Agar ละลายในหม้อนึ่งไอน้ำ หรือตู้ Microwave
2. Sterile ใน Autoclave 121 °C (15 ปอนด์) 15 นาที
3. ลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 50 °C เติม CCD supplement (SR155) 1 vial โดยวิธีปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเก็บใส่ถุงพลาสติกเก็บที่ 4-8 °C

Carry blair transport medium 0.16% Agar

1. ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น Sterile 1000 ml.

- Sodium Thiglycollate	1.5	gm.
- Disodium Phosphate	1.1	gm.
- Sodium Chloride	5.0	gm.
- Agar	1.6	gm.

2. ต้มให้ Agar ละลายในหม้อนึ่งไอน้ำ หรือตู้ Microwave

3. ลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 50 °C เติม Aqueous Calcium chloride 9 ml. เพื่อปรับ pH ให้ได้ 8.4 ml. ถ้าจำเป็น

4. กรอกใส่ขวดแก้วเล็กฝาเกลียว ขวดละ 10 ml. ปิดฝา นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที เพื่อ Sterilize เก็บไว้ที่ 4-8 °C เมื่อจะใช้ให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องให้หายเย็นก่อน

Preston Broth

เป็น Enrichment media สำหรับการเพาะแยกเชื้อ *Campylobacter* spp.

1. ละลาย Nutrient broth no. 2.25 gm. ในน้ำกลั่น Sterile 475 ml. อุณหภูมิให้ละลาย

2. Sterile ใน Autoclave 121 °C (15 ปอนด์) 15 นาที

3. ลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 50 °C เติม Lysed Horse blood 25 ml. โดยวิธีปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากัน

4. เติม 1/1 Acetone /น้ำกลั่น Sterile 2 ml. ลงใน Vial Selective Supplement SR117 (oxid) เขย่าเบาๆ ให้ละลายเติมลงใน Media ผสมให้เข้ากัน

5. ใส่ในหลอดแก้วจุกเกลียว หลอดละ 5 ml. ด้วยวิธีการปลอดเชื้อเก็บไว้ที่ 4-8 °C เมื่อจะใช้ให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องให้หายเย็นก่อน

Brucella 0.16% agar

เป็น Stock media สำหรับเก็บรักษาเชื้อ *Campylobacter* spp.

1. ผสม Brucella broth 28 gm.

Agar 1.6 gm.

(ถ้าไม่มีใส่ Agar จะเป็น Brucella broth ธรรมดา) ลงในน้ำกลั่น 1000 ml. เขย่าให้เข้ากัน

2. ต้มให้เดือด 1 นาที เพื่อให้ละลายหมดสมบูรณ์

3. ลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 45-50 °C ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.00 ถ้าจำเป็น โดยใช้สารละลาย 1 NaoH หรือสารละลาย HCL

4. ใส่ในหลอดแก้วจุกเกลียว หลอดละ 10 ml. Sterile ใน Autoclave 121 °C (15 ปอนด์) 15 นาที เสร็จแล้วรอให้เย็นลงปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่ 4-8 °C เมื่อจะใช้ให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องให้หายเย็นก่อน

วิธีการเก็บเชื้อ *Campylobacter* spp. ใน Brucella 0.16% agar

ป้ายเชื้อ *Campylobacter* spp. อายุ 24-48 ชั่วโมง 1 loop เต็มใส่ลงบนผิวหน้าของ Media ในหลอดให้ลึกประมาณ 1 cm. ปิดฝาให้แน่น นำไปบ่มที่ 37 °C เก็บไว้ได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ถ้าต้องการเก็บนานกว่านั้นให้ถ่ายเชื้อลงใน Brucella 0.16% aga หลอดใหม่

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brucella broth

ส่วนประกอบ

Tryptone	10.0 กรัม
Meat peptic peptone	10.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
Yeast extract	10.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium hydrogen sulfide	0.1 กรัม
Distilled Water	1000 มิลลิลิตร

pH : 7.0 ± 0.2

ซังสารต่างๆ ให้ได้ตามส่วนประกอบข้างต้น เเทน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชประมาณ 7 แบ่งอาหารใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. Campylobacter Blood-Free Selective AgarBase (ModifiedCCDA-Preston)

ส่วนประกอบ

Nutrient Broth No. 2	25.0 กรัม
Bacteriological Charcoal	4.0 กรัม
Casein hydrolysate	3.0 กรัม
Sodium desoxycholate	1.0 กรัม
Ferros sulfate	0.25 กรัม
Sodium pyruvate	0.25 กรัม
Agar	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	500 กรัม

pH : 7.4 ± 0.2

หมายเหตุ: ผลิตภัณฑ์ของบริษัท OXOID LTD

ชั่ง *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base ปริมาณ 22.75 กรัม ผสมลงใน น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนเพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้เป็น 7.4 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5°C 15 นาที

ในกรณีที่ใช้อาหารชนิดนี้ในขั้นตอนการนับเชื้อ หลังจากฆ่าเชื้อแล้วให้รอจนอาหารมี อุณหภูมิตกลงเหลือ 50°C จากนั้นเติม CCDA Selective Supplement (SR155E) ที่ทำการผสมด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วลงไป 1 Vial ด้วยวิธีการปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน จากนั้น เทลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ

3. CCDA Selective Supplements (code SR 155E)

ส่วนประกอบ (1Vial)

Cefoperazone	16 มิลลิกรัม = 32 มิลลิกรัม/1 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ
Amphotericin	5 มิลลิกรัม = 10 มิลลิกรัม/1 ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร/ 1 vial ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ผสมให้ละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน พยายามอย่าให้เกิดฟอง 1 vial ใช้สำหรับเติมอาหาร *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร

4. Hippurate broth

ส่วนประกอบ

Sodium hippurate	0.5 กรัม
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

ชั่งสารปริมาณ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วย กระดาษกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งอาหารใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

5. Pepton Water

ส่วนประกอบ

Peptone from meal	10.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Phosphate buffer	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

pH : 7.2 ± 0.2

ซังสารต่างๆ ให้ได้ตามส่วนประกอบข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันปรับพีเอช ให้ได้ 7.2 ± 0.2 แบ่งใส่ขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5°C 15 นาที

6. Peptone 0.1%

ส่วนประกอบ

Peptone	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

pH : 7.2 ± 0.2

ซังสารต่างๆ ให้ได้ตามส่วนประกอบข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันปรับพีเอช ให้ได้ 7.2 ± 0.2 แบ่งใส่ขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.5°C 15 นาที

7. สารเคมีสำหรับทดสอบ Oxidase

ส่วนประกอบ

N. N. N ¹ . N ¹ Tctranchyl -1,4- Phenylenediarimine dihydrochloride	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้เข้ากัน ต้องเตรียมไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

8. Ninhydrin solution 3.5%

ส่วนประกอบ

Ninhydrin	1.75 กรัม
Acetone	25 มิลลิลิตร
Butanol	25 มิลลิลิตร

ผสม Acetone กับ Butanol ให้เข้ากันเติม Ninhydrin 1.75 กรัม เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันใช้กับการทดสอบการใช้ Hippurate