<u>ตัวชี้วัดที่ ๓.๓๕</u>

ระดับความสำเร็จของการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ

<u>ระดับที่ ๔</u> มีผลผลิตตรงตามเป้าหมายที่กำหนด

จัดทำคู่มือ (Test method) การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp.
ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ

กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
PUBLIC HEALTH LABORATORY DIVISION

คู่มือการทดสอบ
การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ

(รหัสเอกสาร : TM-MI)

ฉบับที่ : 01 แก้ไขครั้งที่ : 00 วันที่มีผลบังคับใช้ : 31/01/2567

ผู้จัดทำ / Prepared by	ผู้ทบทวน / Reviewed by	ผู้อนุมัติ / Approved by
.....	.....	.....
(นางสาวพัทยา พลวิชัย)	(นางสาวพชรภร แก้วสำราญ)	(นางสาวพชรภร แก้วสำราญ)
วันที่ 29/01/2567	วันที่ 30/01/2567	วันที่ 31/01/2567

1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นมาตรฐานปฏิบัติงานสำหรับการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ

2. ขอบข่าย

คู่มือการทดสอบฉบับนี้ใช้สำหรับการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real time - Polymerase Chain Reaction (Real - time PCR) ในตัวอย่างน้ำ

3. นิยาม

ไม่มี

4. เอกสารอ้างอิง

4.1 ISO 11731 : 2017 Water quality – Enumeration of *Legionella*

5. แบบฟอร์ม

ไม่มี

6. เครื่องมือและอุปกรณ์

6.1 เครื่องมือ

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER^3
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น ME-T3002T ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรด – เบส (pH meter) รุ่น S20 ยี่ห้อ Mettler Toledo
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SX-700 ยี่ห้อ Tomy อุณหภูมิ 121 ± 3 องศาสเซลเซียส
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) รุ่น NU-543 ยี่ห้อ NuAire
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น KB720 ยี่ห้อ Binder อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาสเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Eppendorf, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น BAD-12 ยี่ห้อ RAYPA อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส
- ชุดกรองตัวอย่างน้ำ (Membrane filtration equipment)
- เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex sheker) ยี่ห้อ Heidolph
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie2 ยี่ห้อ Genie
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 100-1,000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 10-100 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipettes) ปริมาตร 0.5-10 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf

6.2 อุปกรณ์

- แผ่นกรอง (Membrane filter) ชนิด polycarbonate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (PALL, USA)
- ปิเปตทิป (pipette tip) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- ปิเปตทิปแบบมีแผ่นกรอง (pipette filter tip) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ไมโครลิตร
- หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (test tube rack)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- ขวดแก้วขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- หลอด PCR ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

7.1 สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture)

- Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)
- Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)
- Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)
- Tryptic Soy Agar (TSA)
- Tryptic Soy Broth (TSB)
- Plate Count Agar (PCA)
- สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

7.2 สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรม ด้วยวิธี Real time PCR

- ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP^{TM} Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany)
- ชุดน้ำยา PCR สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของ Legionella spp. (PCR max^{TM})

8. เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference Culture)/ วัสดุอ้างอิง (RM)/ วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM)

8.1 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (Reference Culture)

- *Legionella pneumophila* (DMST 12800)
- *Escherichia coli* (DMST 4212)
- *Klebsiella pneumoniae* (DMST 7592)
- *Klebsiella aerogenes* (DMST 8841)
- *Staphylococcus aureus* (DMST 8013)
- *Staphylococcus epidermidis* (DMST 5868)
- *Pseudomonas aeruginosa* (DMST 4739)
- *Salmonella* Typhimurium (DMST 562)

9. วิธีการปฏิบัติงาน

การทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ในตัวอย่างน้ำ มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

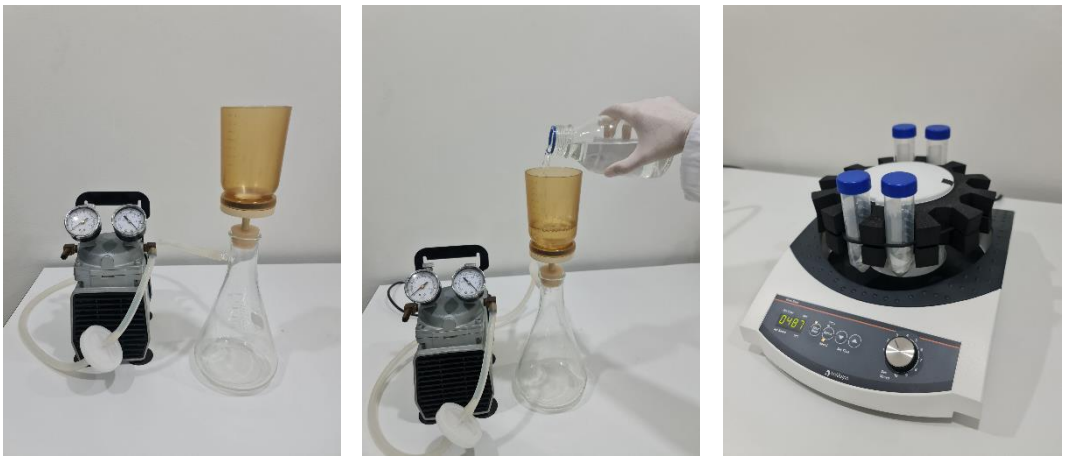
9.1 การทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (Sample concentration)

เป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทดสอบ เพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น เหมาะสมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR ต่อไป โดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการ concentrate ตัวอย่างด้วยวิธีการกรองผ่านแผ่นกรอง (Membrane filtration) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

9.1.1 นำตัวอย่างปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร

9.1.2 นำแผ่นกรองที่ผ่านการกรองตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และ resuspend ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

9.1.3 นำไป Vortex ประมาณ 15 นาที เพื่อชะให้เชื้อหลุดออกจากแผ่นกรอง ได้เป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเพียงพอสำหรับนำไปทดสอบต่อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และวิธี Real-time PCR



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ด้วยวิธีการกรอง (Membrane filtration)

9.2 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ

9.2.1 ทำการ Inoculate ตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC plate

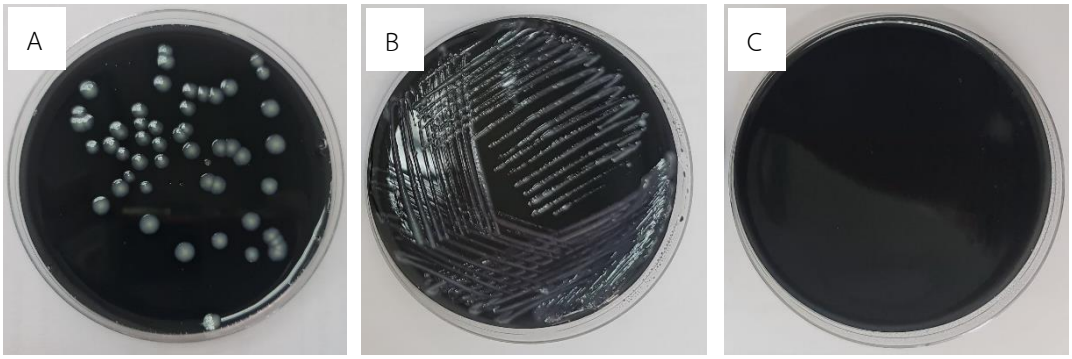
9.2.2 spread plate ให้ตัวอย่างเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค Spread plate

9.2.3 นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-10 วัน

9.2.4 ถ้าพบโคโลนของเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม มันวาว สีขาว-เทาเกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ GVPC และเมื่อนำไปย้อมสีแกรมพบลักษณะ gram negative rod ให้นำโคโลนีดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE) และ BCYE ที่ไม่มีส่วนประกอบของ L-cysteine (BCYE-cys) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน

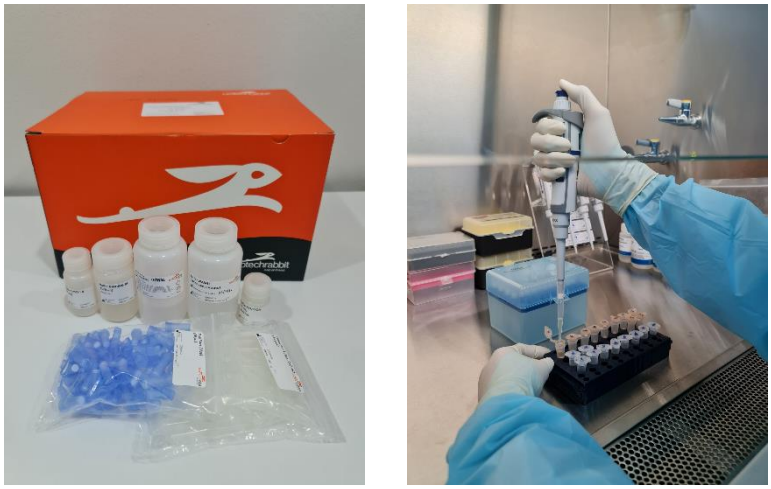
9.2.5 กรณีเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE ที่มีส่วนประกอบของ L-cysteine เท่านั้น ให้บันทึกผลเป็น Detected (พบเชื้อ *Legionella* spp.) แต่หากเชื้อเจริญหรือไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้บันทึกผลเป็น Not Detected (ไม่พบเชื้อ *Legionella* spp.)



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Legionella* spp. ที่ขึ้นบน plate GVPC agar (A) จากนั้นไปเพาะเลี้ยงต่อ (re-streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE (B) และ BCYE-cys (C)

9.3 การตรวจหาเชื้อ *Legionella* spp. ด้วยวิธี Real-time PCR

9.3.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการ Concentrate ด้วยวิธี Membrane filtration ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาสกัด DNA โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำหรับแบคทีเรีย (GenUP™ Bacteria gDNA Kit, Berlin, Germany) ทำตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ระบุในชุดสกัด



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรม GenUP™ Bacteria gDNA Kit

9.3.2 DNA ที่สกัดได้ นำไปตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อ *Legionella* ด้วยวิธี Real-time PCR หรือเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสสำหรับรอการทดสอบต่อ

9.3.3 เตรียมส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR (master mix) ลงในหลอด PCR ซึ่งปริมาตรที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR (Master Mix) สำหรับ 1 ตัวอย่างทดสอบ (Reaction)

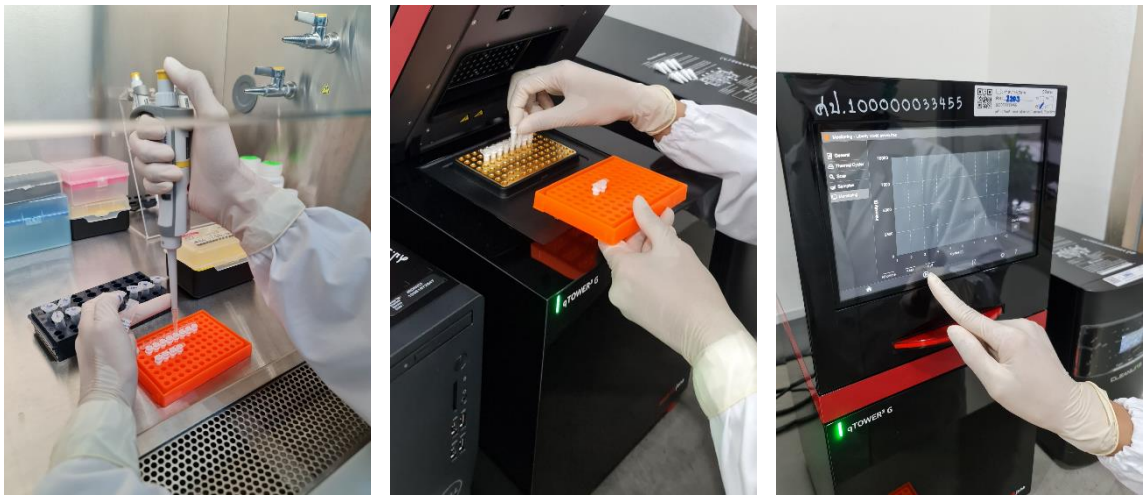
ส่วนประกอบ/ 1 reaction	
2X qPCR Master Mix	10 ไมโครลิตร
Legionella spp. Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
Internal Extraction Control Primer/probe mix	1 ไมโครลิตร
nuclease-free water	3 ไมโครลิตร
DNA sample (Template)	5 ไมโครลิตร
Final volume	**20 ไมโครลิตร**

9.3.4 นำหลอด PCR ที่บรรจุส่วนประกอบหลักของปฏิกิริยา PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Real-time PCR) ยี่ห้อ Analytik Jena รุ่น qTOWER3 โดยใช้ DNA ของเชื้อ *Legionella pneumophila* เป็นตัวควบคุมผลบวก และ nuclease-free water เป็นตัวควบคุมผลลบ โดยสภาวะของปฏิกิริยา PCR ตั้งค่าดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ**	**เวลา**	**จำนวนรอบ**
Enzyme activation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	10 วินาที	50 รอบ
Annealing and extension *	60 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

* เป็นขั้นตอนที่มีการเก็บข้อมูลการเรืองแสงของสารเรืองแสงเป้าหมาย คือ FAM

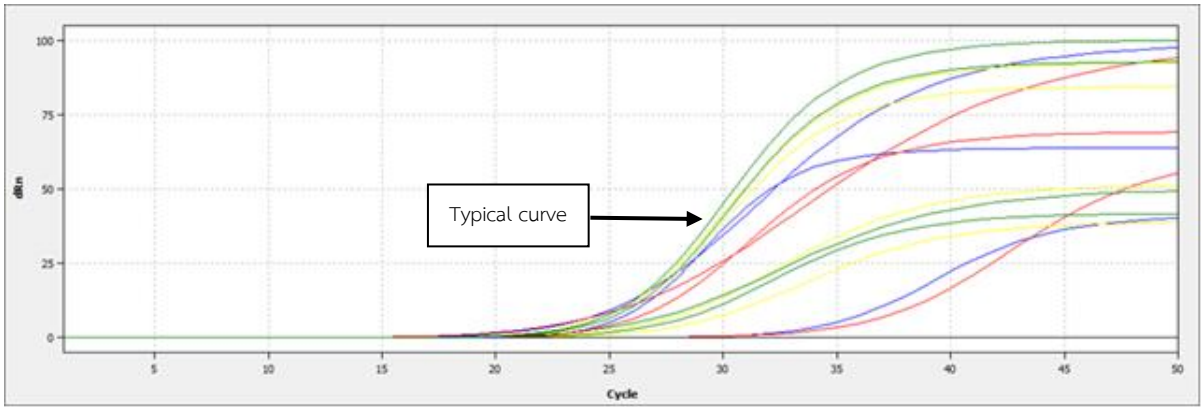


ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเตรียม master mix และการตั้งค่าสภาวะของปฏิกิริยา สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp.

10. การแปลผลการทดสอบและการควบคุมคุณภาพ

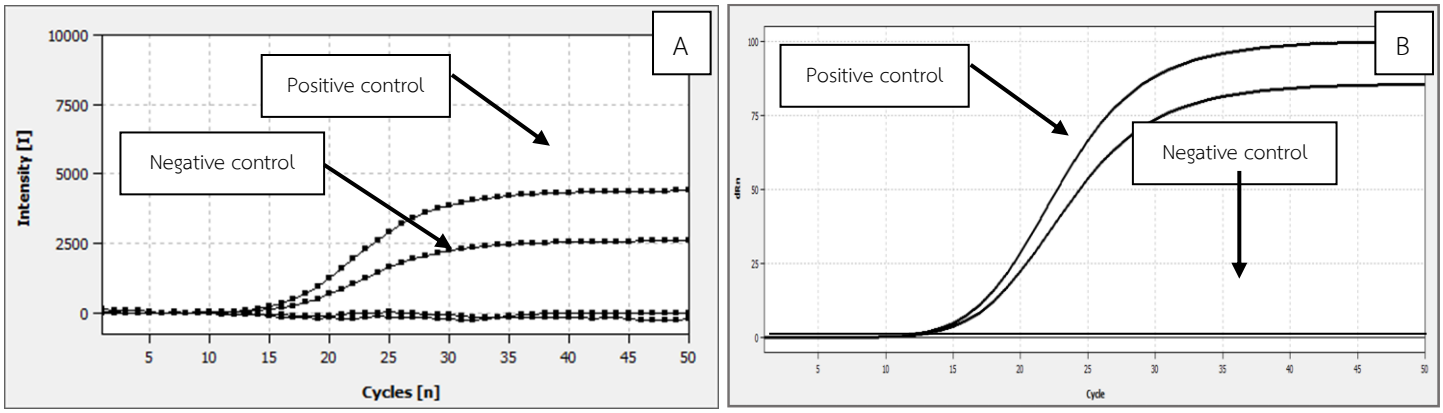
10.1 ก่อนการแปลผลการทดสอบตัวอย่างต้องตรวจสอบค่าการควบคุมคุณภาพการทดสอบทุกครั้ง ดังนี้

- ตรวจสอบลักษณะ curve ของ real time plot ว่าเป็น curve ที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)



ภาพที่ 6 ลักษณะของกราฟที่มีลักษณะปกติ (S curve: Typical curve)

- Positive control ต้องให้ค่า Ct value อยู่ในช่วงที่กำหนด (อยู่ในช่วง 16 ถึง 23)
- Negative control ใช้ Nuclease free water เป็น Negative control ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา PCR ต้องซึ่งต้องไม่มีค่า Ct values



ภาพที่ 7 ลักษณะของกราฟ Positive control และ Negative control
(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

- Internal control ใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพของขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง และการเกิดปฏิกิริยา amplification ซึ่งในการทดสอบต้องแสดงค่า Ct ของ Internal control เพื่อยืนยันว่าขั้นตอนการสกัดและการเกิดปฏิกิริยา amplification เป็นไปอย่างสมบูรณ์
- Duplication เป็นตัวอย่างที่มาจากการทำซ้ำ โดยทำซ้ำอย่างน้อย 10% ของตัวอย่างแต่ละชุดที่ทดสอบ ซึ่งต้องให้ผลการทดสอบเหมือนกับตัวอย่างเดียวกัน

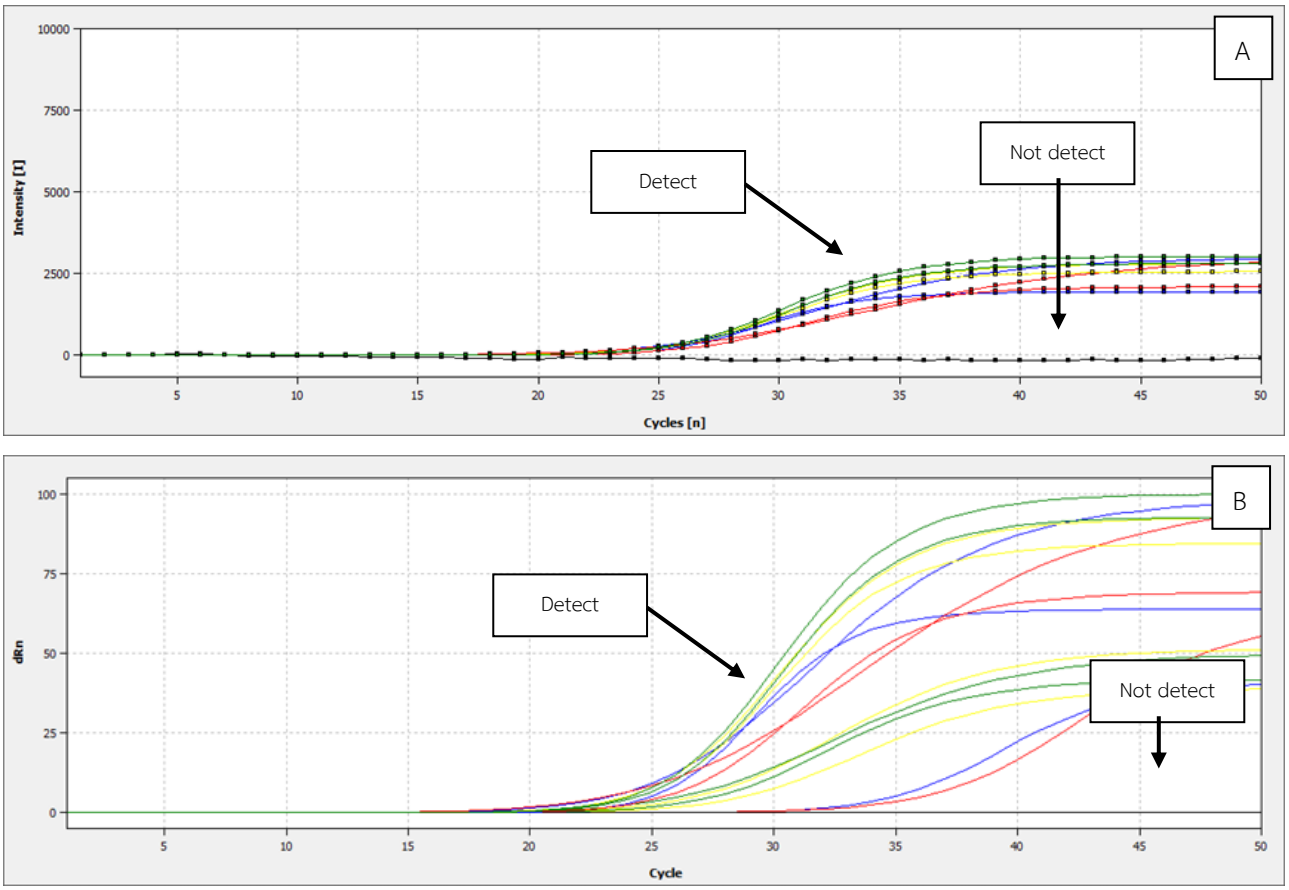
กรณีค่าการควบคุมคุณภาพไม่ผ่านต้องมีการหาสาเหตุและแก้ไขจนค่าการควบคุมคุณภาพผ่านจึงสามารถแปลผลการทดสอบได้

10.2 การแปลผลการทดสอบตัวอย่าง

การอ่านผลจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจนสามารถตรวจวัดได้ (Cycles) และปริมาณแสง Fluorescence ที่ตรวจวัดได้ถ้าในตัวอย่างมีสารพันธุกรรมของเชื้อ *Legionella* spp. อยู่ จะแสดงลักษณะกราฟเป็น S-curve ถ้าไม่มีจะแสดงลักษณะกราฟเป็นเส้นตรง โดยจากกราฟสามารถรายงานได้เป็นค่า Ct ซึ่งค่า Ct คือ จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย จนถึงระดับที่เครื่อง PCR สามารถตรวจวัดได้ การรายงานผลทดสอบดำเนินการดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การแปลผลการทดสอบ โดยพิจารณาจากค่า Ct และค่าการควบคุมคุณภาพ

Target	Internal control	Positive control	Negative control	การแปลผล
≤ 30	+ / -	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	+	+	-	พบเชื้อ (Detect)
> 30	-	+	-	พบเชื้อ (Detect)
-	+	+	-	ไม่พบเชื้อ (Not detect)



ภาพที่ 8 ลักษณะกราฟของตัวอย่างที่พบเชื้อ (Detect) และไม่พบเชื้อ (Not detect)
(A) คือ raw data (B) คือ calculate Ct

11. เอกสารแนบท้าย

11.1 Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide agar (GVPC)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- Activated Charcoal	2	กรัม
- Yeast Extract	10	กรัม
- Agar	15	กรัม
- น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

GVPC Supplement

- Glycine	1.5	กรัม
- Vancomicin	0.0005	มิลลิลิตร
- Polymyxin B Sulphate	40000	IU
- Cyclohexymide	0.04	กรัม
- น้ำกลั่น sterile	10	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย GVPC Supplement ด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ GVPC Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

11.2 Buffered charcoal yeast extract agar with L-cysteine (BCYE)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- Activated Charcoal	2	กรัม
- Yeast Extract	10	กรัม
- Agar	15	กรัม
- น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

BCYE Growth Supplement

- ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid)	5	กรัม
- Potassium Hydroxide	1.4	กรัม
- Ferric Pyrophosphate	0.125	กรัม
- Potassium Alfa-Ketoglutarate	0.5	กรัม
- L-Cysteine HCl	0.2	กรัม
- Sterile solvent	10	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE Growth Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE Growth Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้งาน

11.3 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)

ส่วนประกอบ

BCYE agar base

- Activated Charcoal	2	กรัม
- Yeast Extract	10	กรัม
- Agar	15	กรัม
- น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

BCYE without Cysteine Supplement

- ACES Buffer (N-2-Acetamido-2-Aminoethanesulfonic acid)	5	กรัม
- Potassium Hydroxide	1.4	กรัม
- Ferric Pyrophosphate	0.125	กรัม
- Potassium Alfa-Ketoglutarate	0.5	กรัม
- Sterile solvent	10	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BCYE agar base 13.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- ละลาย BCYE without Cysteine Supplement ด้วย Sterile solvent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในขวด BCYE agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและ BCYE without Cysteine Supplement ให้เข้ากัน จากนั้นเทแบ่งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับใช้งาน

11.4 Tryptic Soy Agar (TSA)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
- Papaic Digest of Soybean	5	กรัม
- Sodium Chloride	5	กรัม

- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein 17 กรัม
- Papaic Digest of Soybean 3 กรัม
- Dextrose 2.5 กรัม
- Sodium Chloride 5 กรัม
- Dipotassium Phosphate 2.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดหรือหลอดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.6 Plate Count Agar (PCA)

ส่วนประกอบ

- Pancreatic Digest of Casein 5 กรัม
- Yeast Extract 2.5 กรัม
- Dextrose 1 กรัม
- Agar 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 23.5 กรัม ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

11.7 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffered water)

ส่วนประกอบ

1) phosphate buffer stock solution

- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 34 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2±0.5 โดยใช้ 1 N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) magnesium chloride stock solution

- magnesium chloride ($MgCl_2$ หรือ $MgCl_2.6H_2O$) 38 หรือ 81.1 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ชั่ง magnesium chloride ตามสัดส่วน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

- ปิเปต phosphate buffer stock solution ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และ magnesium chloride stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2±0.1
- แบ่งใส่หลอดหรือขวดตามปริมาตรที่ต้องการใช้งาน
- จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

12. ประวัติการแก้ไขเอกสาร

ลำดับที่	DAR No.	ฉบับที่	แก้ไขครั้งที่	หน้าที่	รายละเอียดการแก้ไข	วันที่อนุมัติ
1	-	01	00	ทุกหน้า	ออกเอกสารใหม่	31/01/2567