บรรณานุกรม

พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร, เชิดศักดิ์ ธีระบุตร, วิสาณ คงสำราญ และสมหมาย ถุงสุวรรณ, "Bacteriology of Leucorrhoea in Non-specific Infection of the Female Lower Genital Tract," จุลสารชมรมแพทย์โรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย, 3(6),634-650,2523.

ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์, ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์, นิพนธ์ อุดมสันติสุข, อริยา จินดามพร, กาญจนา หริ่มเพ็ง, สมภพ ลิ้มพงศานุรักษ์, ประเสริฐศรี เชื้นตระกูล, เบญจบ ไววณิชกุล, สุชิต เผ่าสวัสดิ์, เอนก อารีพรรค, วลัยภรณ์ วจนะวิสิษฐ์, ปรีดา ทัศนประดิษฐ์, ทรรศนีย์ บุญยัษฐิติ, ประมุข ตันตยาภรณ์, สุทัศน์ กลกิจนาวินท์, อรุณ อมาตยกุล, "ความสัมพันธ์ของจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคกับสตรีที่มีอาการแสดงการติดเชื้อของช่องคลอดและ/หรือ ปากมดลูก ที่มารับการตรวจรักษาทางนรีเวชกรรมหน่วยผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพ ฯ" (ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

Amsel, R., P.A. Totten, C.A. Spiegel, K.C.S. Chen, D. Eschenbach, and K.K. Holmes, "Nonspecific Vaginitis Diagnostic Criteria and Microbial and Epidemiologic Association," Am. J. Med. 74,14,1983.

Arkerlund, M., and P.A. Mardh, "Isolation and Identification of Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis) in Women with Infections of the Lower Genital Tract," Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 53,85-92,1974.

Blackwell, A.L., and D. Barlow,"Anaerobic Vaginosis Clinical and Diagnostic Aspects, "In Bacterial Vaginosis" pp. 129-133. Edited by P.A. Mardh & D. Taylor-Robinson. Uppsala :Almqvist & Wiksell, 1984.

Brewer, J.I., B. Halpern, and B.S. Thomas, " *Haemophilus vaginalis* Vaginitis, "Am. J. Obstet. Gynecol., 74, 834, 1957.

Bret, A.J., and Cohen-Debray., Presse Med., 67, 1611, 1959.

Burmeister, R.E., and H.L. Gardner, "Vaginitis : Diagnosis and Treatment," Postgrad. Medicine, 159-163, 1970.

Cowan,S.T.,"Manual for the Identification of Medical Bacteria," PP.127-229 Cambridge University, New York, 1974.

Curtis, A.H., "A Motile Curved Anaerobic Bacillus in Uterine Discharges," J. Inf. Dis., 12, 165-169, 1913.

Dunkelberg, W.E., Jr., J.D.Hefner, W.E. Patow, F.J. Wyman Jr., and H.I.Orup,"*Haemophilus vaginalis* Among Asymptomatic Women," Obstet. Gynecol. 20, 629, 1962.

Dunkelberg, W.E., Jr.,and I. McVeigh,"Growth Requirements of *Haemophilus vaginalis*," Antonie von Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol., 35, 129-145, 1969.

Durieux, R., and A. Dublanchet, "Les" Vibrions" Anaerobies des Leucorrhees I : Technique d'isolement et Sensibilite aux Antibiotiques,"Medecine et Maladies Infectienses, 10,109-115,1980., quoting Holst, et al., "Characteristics of Anaerobic Comma-shaped Bacteria Recovered from the Female Genital Tract, "Eur. J. Clin. Micro.,1(5), 310-316, 1982.

Eschenbach, D.A., "Vaginal Infection," Clin. Obstet. and Gyn., 26(1), 186-202, 1983.

Finegold, S.M., and E.J. Baron: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, ed. 7, St. Louis., The C.V. Mosby Co.

1986.

Fontaine, E.A., D. Taylor-Robinson, S.P.Borriello, N.F. Hanna, and P. Honour,"Anaerobic Bacteria in Lower Genital Tract Infections," The Lancet, 30,281, 1982.

Fox, A., and I. Phillips, "Two Curved Rods in Non - specific Vaginitis," In Bacterial Vaginosis, pp.93-96. Edited by P.- A., Mardh & D. Taylor-Robinson. Uppsala : Almqvist & Wiksell, 1984.

Friberg, J.,"Genital *Mycoplasma* Infection,"Am. J. Obstet. Gynecol., 132, 673-676,1978.

Gardner, H.L., and C.D. Dukes, "*Haemophilus vaginalis*," Am. J. Obstet. Gynecol., 69(5), 962-976, 1955.

Gardner, H.L., and C.D. Dukes, "The Prevalence of Vaginitis," Am. J. Obstet. Gynecol., 73,1080-1087,1957.

Glupczynski, Y., M.Labbe´, F. Crokaert, F. Pepersóck, P.V.D. Auwera,and E.YourassOwsky, "Isolation of *Mobiluncus* in Four Cases of Extragenital Infections in Adult Women," Eur. J. Clin. Micro., 3(5), 433-435, 1984.

Greenwood, J.R., and M.J. Pickett, "Salient Features of *Haemophilus vaginalis*," J. of Clin. Micro. Feb., 200-204, 1979.

Greenwood, J.R., and M.J. Pickett, "Transfer of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) To a New Genus, *Gardnerella*," Int. J. System Bacteriol, 30,170,1980.

Hallen, A., U. Forsum, E.Hjelm, C. Pahlson & J.Wallin, "Motile, Anaerobic Curved Rods in Women Attending an

STD-Clinic, "Scand. J. Nephrol. Urol., Suppl.86,153, 1984.

Hayat, M.A., "Negative Staining, "Principle and Technique of Electron Microscopy," Vol.2,99, 1972.

Hjelm, E.,"Anaerobic Curved Rods in Vaginitis,"The Lancet ii, December 12, 1353-1354, 1981.

Hjelm, E., A. Hallen, U. Forsum, and J.Wallin, "Motile Anaerobic Curved Rods in Nonspecific Vaginitis," European J. of Sex. Trans. Disease, 1, 9-14, 1982.

Holdeman, L.V., W.E.C.Moore: "Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.

Holst, E., H.Hofmann, and P.- A. Mardh, "Anaerobic Curved Rods in Genital Samples of Women,Performance of Different Selective Media,Comparison of Detection by Microscopy and Culture Studies, and Recovery from Different Sampling Sites, "Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.,86,117-124, 1984(a).

Holst, E., P.-A. Mardh and I. Thelin, "Recovery of Anaerobic Curved Rods and *Gardnerella vaginalis* from the Urethra of Men, Including Male Heterosexual Consorts of Female Carriers, "Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.86,173-177, 1984(b).

Holst, E., A. Skarin, and P.-A. Mardh, "Characteristics of Anaerobic Comma-shaped Bacteria Recovered from the Female Genital Tract,"Eur. J. Clin. Micro.,1(5),310-316, 1982.

Holst, E., A. Skarin, and P.-A. Mardh, "Anaerobic Comma-shaped Bacteria Recovered from the Human Genital Tract, "Scand. J.Inf.Dis., Suppl.40,23-30, 1983.

Holst, E., L.Svensson, A. Skarin, L. Westrom, and P.- A. Mardh, "Vaginal Colonization with *Gardnerella vaginalis* and Anaerobic Curved Rods,"Scand. J. Urol. Nephrol.Suppl.86, 147-152,1984.

Hwang, M. and G.M. Ederer, "Rapid Hippurate Hydrolysis Method for Presumptive Identification of Group B Streptococci," J.Clin.Microbiol., 1,114,1975.

Ison, C.A., S.G. Dawson, J. Hilton, G.W.C sonka, and C.S.F. Easmon, "Comparison of Culture and Microscopy in the Diagnosis of *Gardnerella vaginalis* Infection,"J. Clin. Pathol., 35,550, 1982.

Jones, B.M., I-Geary, A.B., Alawatlegama, G.R., Kinghorn, B.I., Duerden. In-vitro and In-vivo Activity of Metronidazole Against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp. and *Mobiluncus* spp. in Bacterial Vaginosis," J. Antimicrob. Chemother.,16(2),189-197, 1985.

Kodaka, H., A.Y. Arnifield, G.L. Lombard, and V.R. Dowell, "Practical Procedure for Demonstrating Bacteria Flagella," J. Clin. Microbiol., 16,948-952, 1982.

Kohn, J., "A Preliminary Report of a New Gelatin Liquefaction Method," J. Clin. Path., 6,249, 1953.

Lapage, S.P.,"*Haemophilus vaginalis* and Its Role in Vaginitis," Acta.Path.Microbiol.Scand., 52, 34, 1961.

Lennette, E.H., and Others editors. Manual of Clinical Microbiology 3rd. ed., Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980.1044p.

Leopold, S., "Heretofore Undescribed Organism Isolated from the Genitourinary System,"Armed Forces Med., 4,263-266, 1953.

Lewis, J.F., S.M. O'Brien, U.M. Urol, and T.Burke, "*Corynebacterium vaginale* Vaginitis. Review of the Literature and Presentation of Data Based on Vaginal Cultures from 1,008 Patients,"Am. J. Obstet. Gynecol., 112(1), 87-90, 1972.

Lowe, et al. J. of Medical Laboratory Technology, 19,21-25, 1962.

Mardh, P.- A., E.Holst, and B.R. Moller, "The Grivet Monkey As a Model for Study of Vaginitis,"Scand. J. Urol. Nephol. Suppl. 86,201-205, 1984.

Mardh, P.- A., and L. Westrom, "Adherence of Bacteria to Vaginal Epithelial Cells," Infect. Immun., 13,661, 1976.

Mayhew, J.W., A.B. Onderdonk and S.L. Gorbach, "Effects of Time and Growth Media on Short Chain Fatty Acid Production by *Bacteroides fragilis*," Appl. Microbiol., 29,472-475, 1975.

Monif, G.R.G., "Infectious Disease in Obstetric and

Gynecology Hagerstown" : Harper Ron Publishers, Inc. 1974.

Moore, B., "Observations on a Group of Anaerobic Vaginal Vibrio, "J. of Path.and Bact., 67, 461-473, 1954.

Pahlson, C., F. Bergqnst and U. Forsum, "Numerical Taxonomy of Motile Anaerobic Curved Rods Isolated from Vaginal Discharge, "Scand. Urol. Nephro. Suppl. 86,251-256. 1984.

Pheifer, T.A., P.S. Forsyth, M.A. Durfec, H.M.Pollock, and K.K. Holmes, " Nonspecific Vaginitis : a Role of *Haemophilus vaginalis* and Treatment with Metronidazole, "N. Engl. J. Med. 298,1429-1434. 1978.

Phillips, I., and E. Taylor, "Anaerobic Curved Rods in Vaginitis,"The Lancet, 23, 221, 1982.

Piot, P., E.V. Dyck, P.Godts, and J. Vanderheyden, "The Vaginal Microbial Flora in Non-specific Vaginitis," Eur. J. Clin. Microbiol., 1(5), 301-306, 1982.

Ralph, E.D., and Y.E. Amatnieks, "Relative Susceptibilities of *Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis), Neisseria gonorrhoeae,* and *Bacteroides fragilis* to Metronidazole and its Two Major Metabolites, "The American Venereal Disease Association, 157-160,1980.

Ralph, E.D., T.W. Austin, and F.L.M. Pattison, "Inhibition of *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)* by Metronidazole, Tetracycline, and Ampicillin," Sex. Transm.Dis., 6,199-202, 1979.

Ridway, G.L., and J.D. Oriel,"Interrelationship of *Chlamydia*

trachomatis and Other Pathogens in the Female Genital Tract," J. Clin. Pathol., 30,933-936, 1977.

Ritzerfeld, W., and J. Kummel, Zbl.Bakt., Abt. I Orig. 180,334, 1960.

Robert, M.C., S.L. Hiller, F.D. Schoenknecht and K.K. Holmes, "Comparison of Gram Stain, DNA Probe, and Culture for the Identification of Species of *Mobiluncus* in Female Genital Specimens," The J. of Infect Diseases, 152(1), July, 1985.

skoog, D.A., and D.M. West, "Fundamental of analytical chemistry 2nd ed Holt, Rinchart and Winston, Inc., USA, 1969.

Skarin, A., E. Holst, and P.- A. Mardh, "Antimicrobial Susceptibility of Comma-shaped Bacteria Isolated from the Vagina", Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 40, 81-84, 1983.

Skarin, A., L. Larsson, E. Holst, P.- A. Mardh, "Gas Chromatographic Study of Cellular Fatty Acids of Comma-Shaped Bacteria Isolated from the Vagina," Eur. J. Clin. Micro.,307-309, 1982.

Spiegel, C.A., D.A. Eschenbach, R. Amsel, and K.K. Holmes, "Curved Anaerobic Bacteria in Bacterial (Nonspecific) Vaginosis and Their Response to Antimicrobial Therapy, "The J. of Inf. Disease, 148 (5), 817-822, 1983.

Spiegel, C.A., and M. Roberts "*Mobiluncus* gen. nov., *Mobiluncus curtisii* subsp. *curtisii* sp. nov.,

Mobiluncus curtisii subsp. *holmesii* subsp. nov. and *Mobiluncus mulieris* sp. nov., Curved Rods from the Human Vagina," International Journal of Systematic Bacteriology, 34(2),177-184, 1984.

Sprott, M.S., H.R. Ingham, R.S. Pattman, L.M. Clarkson, A.A. Codd and H.K. Narang, "Motile Curved Bacilli Isolation and Investigation," In Bacterial Vaginosis pp. 107-111. Edited by P.- A. Mardh & D. Taylor-Robinson. Uppsala : Almqvist & Wiksell, 1984.

Sprott, M., H.R. Ingham, R.S. Pattman, R.L. Eisenstadt, G.R. Short, H.K. Narang, and R.S.J.B. Selkon, "Characteristics of Motile Curved Rods in Vaginal Secretion, "J. Med. Micro., 16, 175-182, 1983.

Sutter, V.L., and J.A. Washinton II. "Susceptibility Testing of Anaerobes,"in Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler JR. and J.P. Truant., editors. Manual of Clinical Microbiology. 3rd. ed., Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. p.475-476.

Swenson, R.M., T.C. Michaelson, M.J. Daly, and E.H. Spaulding, "Anaerobic Bacterial Infections of the Female Genital Tract," Obstet Gynecol., 42,538-541, 1973.

Thomason, J.L., P.C. Schreckenberger, W.N. Spellacy, L.J. Riff, and L.J. LeBeau,"Clinical and Microbiological Characterization of Patients with Nonspecific Vaginitis Associated with Motile, Curved Anaerobic

Rods," The J. of Infect. Dis., 149(5),801-809, 1984.

Totten, P.A., R. Amsel, J. Hale, P. Piot, and K.K. Holmes, "Selective Differential Human Blood Bilayer Media for Isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*," J. of Clinical Microbiology, 15(1) 141-147, 1982.

Vera, H.D , Power, D.A., "Culture media," In Manual of Clinical Microbiology pp.965-993 Edited by. Lennette, E. H., Balows, A., Hausler Jr., W.J., and Trunt, J.P.; 3rd Ed: American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980.

Vetere. A., S.P. Borriello, E. Fontaine, P.J. Reed, and D. Taylor-Robinson,"Characterisation of Anaerobic Curved Rods (*Mobiluncus* spp.) Isolated from the Urogenital Tract," J. Med. Microbiol., 23, 279-288, 1987.

Watt, B., P.A. Geddes, P.A. Geddes, O.A. Greenan, S.K. Napier and A. Mitchell, "Gas Liquid Chromatography in the Diagnosis of Anaerobic Infections : A Three Year Experience," J. Clin. Pathol., 35,709-714, 1982.

Willis, A.T., Anaerobic Infections Update Postgraduate Centre Series London : Update Publication Ltd. p.15,1983.

Zinnemann, K., and G.C. Turner, "The Taxonomic Position of *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)*," J. Path. Bact., 85,213, 1963.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารละลายยาปฏิชีวนะ

การเตรียมสารละลายยาปฏิชีวนะstock solution (Antibiotic Solutions)

1. Ampicillin (Siam Chemi-Pharm L.P.) เตรียม Stock Ampicillin 2560 ไมโครกรัม / มล. โดยชั่งยา standard ampicillin powder 0.02726 กรัม ใน 0.1 M. phosphate buffer pH 8.0 ที่ปราศจากเชื้อ 10 มล.

2. Metronidazole (Siam Bheasacc CO., Ltd.) เตรียม Stock Metronidazole 2560 ไมโครกรัม / มล. โดยชั่งยา standard metronidazole 0.0255 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มล.

3. Tetracycline (Dumex Ltd.) เตรียม Stock Tetra - cycline 2560 ไมโครกรัม / มล. โดยชั่งยา standard tetracycline 0.0274 กรัมในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มล.

ภาคผนวก ข

สารละลายบัฟเฟอร์

1. Sorensen's buffer solution, pH 7.4

ส่วนประกอบ

M/15 KH_2PO_4	18	ml
M/15 Na_2HPO_4	82	ml

วิธีเตรียม

ผสม KH_2PO_4 และNa_2HPO_4 ให้เข้ากันแล้วปรับ pH เท่ากับ 7.4

2. 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

ส่วนประกอบ

Sodium Phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	31.21	g
Sodium Hypophosphate (Na_2HPO_4)	28.4	g

วิธีเตรียม

1. ละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ ด้วยน้ำกลั่น 1000 มล. เป็นสารละลาย A

2. ละลาย Na_2HPO_4 ด้วยน้ำกลั่น 1000 มล. เป็นสารละลาย B

Working Solution

สารละลาย A 95 มล. ผสมกับสารละลาย B 405 มล.

3. 0.1 M Phosphate buffer, pH 8.0

ส่วนประกอบ

NaH_2PO_4	0.33	g
K_2HPO_4	0.92	g
Distilled water	900.00	ml

วิธีเตรียม

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 °ซ นาน 15 นาที

ภาคผนวก ค

สีย้อม

1. Gram's staining method reagents (Hucker's) ประกอบด้วย

    1. Crystal Violet solution
    2. Iodine solution
    3. Counterstain

1.1 Crystal Violet solution

ส่วนผสม

Crystal violet	2.0	g
Ethyl alcohol 95%	20.0	ml
Ammonium oxalate	0.8	g
Distilled water	80.0	ml

วิธีการเตรียม

ละลาย crystal violet ลงในแอลกอฮอล์และละลาย ammonium oxalate ลงในน้ำกลั่น ต่อมาจึงผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน ต้องผสมก่อนใช้ 24 ชั่วโมง

1.2 Iodine solution

ส่วนผสม

Iodine	1	g
Potassium iodide	2	g
Distilled water	100	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น และคนจนกว่าจะละลายหมด

1.3 Safranin O solution

ส่วนผสม

Safranin O	0.25	g
Ethyl alcohol	10.0	ml
Distilled water	100.0	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Safranin O ลงใน ethyl alcohol แล้วจึงค่อยเติมน้ำกลั่นจนครบ

2. Flagella staining method reagent (Ryus' method)ประกอบด้วย

ส่วนผสม

สารละลายที่ 1 ประกอบด้วย

5% Carbolic acid	10	ml
Tannic acid	2	g
Saturated aluminium potassium sulphate - 12 hydrate	10	ml

Columbia CNA agar (Holst, et al. 1982)

ส่วนผสม

Pancreatic Digest of Casein	10.0	g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0	g
Yeast Autolysate	5.0	g
Pancreatic Digest of Heart Muscle	3.0	g
Corn Starch	1.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	13.5	g
Colistin	0.01	g
Nalidixic acid	0.01	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดีและทิ้งให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ Nalidixic acid(Wintomylon) 5 ไมโครกรัม/มล. และซีรัมม้าร้อยละ 2.5 เทใส่จานอาหารเปล่า 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

3. มีเดียสำหรับเพาะแยกเชื้อ *G.vaginalis*

Human Blood Bilayer Tween Media (HBT) (Totten et al.1982)

ส่วนผสม

Columbia CNA agar base (BBL)	42.5	g
Proteose peptone No 3. (Difco)	10.0	g

สารละลายที่ 2 ประกอบด้วย

Crystal violet	12	g
Ethanol	100	ml

วิธีเตรียม

ใช้สารละลายที่หนึ่ง 10 ส่วน (mordant) ผสมกับสารละลายที่สอง 1 ส่วน (stain) โดยผสมสีก่อนใช้เสมอ

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

มีเดียสำหรับนำส่งสิ่งตรวจ

1. Modified Stuart's medium

ส่วนผสม

Sodium thioglycollate	1.0	g
Sodium glycerophosphate	10.0	g
Calcium chloride	0.1	g
Methylene blue	0.002	g
Agar	10.0	g
Distilled water	950.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 950 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3 ± 0.2 ใส่ผงถ่านร้อยละ 2 เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

มีเดียสำหรับเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

2. มีเดียสำหรับเพาะแยกเชื้อ *Mobiluncus*

Columbia CNA agar (Holst, et al. 1982)

ส่วนผสม

Pancreatic Digest of Casein	10.0	g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0	g
Yeast Autolysate	5.0	g
Pancreatic Digest of Heart Muscle	3.0	g
Corn Starch	1.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	13.5	g
Colistin	0.01	g
Nalidixic acid	0.01	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดีและทิ้งให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ Nalidixic acid(Wintomylon) 5 ไมโครกรัม/มล. และซีรัมม้าร้อยละ 2.5 เทใส่จานอาหารเปล่า 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

3. มีเดียสำหรับเพาะแยกเชื้อ *G.vaginalis*

Human Blood Bilayer Tween Media (HBT) (Totten et al.1982)

ส่วนผสม

Columbia CNA agar base (BBL)	42.5	g
Proteose peptone No 3. (Difco)	10.0	g

Distilled water	1000.0	ml
Tween 80 (BBL)	0.075	ml
Amphotericin B (fungizone)	2000.0	µg.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสม basal layer (Columbia CNA agar + Proteose peptone No.3) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ Tween 80 และ Amphotericin B เทใส่จานอาหารเปล่า 7 มล. อบให้ผิวหน้าแห้ง

ส่วนของ Over layer (Columbia CNA agar + Proteose peptone No. 3) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่ 50 °ซ จึงใส่ Tween 80 , Amphotericin B และเลือดคนร้อยละ 5 เทใส่ petridish ที่มี basal layer 14 มล. อบให้ผิวหน้าแห้ง

4. มีเดียสำหรับการศึกษาทางชีวเคมี

4.1 การเตรียมส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 การเตรียมสารละลายเฮมิน (Holdeman et al.1974)

ละลายเฮมิน 50 มก.ใน NaOH 1 N จำนวน 1 มล.เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.ทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที stock solution มีความเข้มข้น 500 มก./มล.

ใช้ stock solution 10 มล.ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มล. ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5.0 มก./มล.

4.1.2 การเตรียม Resazurin solution (Holdeman et al. 1974)

ละลาย resazurin 25 มก. ในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บ stock solution ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์แสดง oxidation-reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.3 <u>การเตรียม Salt solution</u> (Holdeman et al.1974)

<u>ส่วนผสม</u>

Calcium chloride (anhydrous)	0.2	g
Magnesium sulphate (anhydrous)	0.2	g
Dipotassium phosphate	1.0	g
Monopotassium phosphate	1.0	g
Sodium bicarbonate	10.0	g
Sodium chloride	2.0	g

<u>วิธีเตรียม</u>

หลังจากละลาย $CaCl_2$ และ $MgSO_4$ ในน้ำกลั่น 300 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 500 มล. เติมเกลือแร่ที่เหลือพร้อมกับคนไปด้วย จนละลายหมด เติมน้ำกลั่นอีก 200 มล. คนให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

4.1.4 <u>การเตรียม Vitamin K-hemin solution</u> (VK-H)

<u>ส่วนผสม</u>

Hemin (Sigma hemin, type III)	50	mg
1 N NaOH	1	ml
Distilled water	99	ml
Vitamin K (Konakion, Roche)	10	mg

วิธีเตรียม

นำ hemin solution ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยautoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เติม sterile Vitamin K 1 ampule เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

4.2 การเตรียมอาหารทดสอบเชื้อ

อาหารทดสอบที่ใช้กับเชื้อ *Mobiluncus* จะต้องเติมซีรัมกระต่ายให้เป็นร้อยละ 2 ดังนี้

Bile medium

Broth Sugar โดยใช้ peptone yeast extract broth (PY) เป็น base medium เติมคาร์โบไฮเดรต 18 ชนิด คือ glucose, sucrose, mannitol, fructose, maltose, xylose, arabinose, salicin, rhamnnose, esculin, trehalose, lactose, inositol, mannose, raffinose, adonitol, starch, inulin

Gelatin

H_2S medium

Motility medium

Nitrate medium

O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside broth (ONPG)

Peptone-Yeast Extract Glucose broth (PYG)

Hippurate hydrolysis

Starch hydrolysis

broth ที่ไม่ต้องใส่ซีรัมกระต่ายได้แก่ starch, maltose และ trehalose

4.2.1 Bile medium

ส่วนผสม

Bacto-Peptone	0.5	g
Trypticase Soy Broth	0.5	g
Yeast Extract	1.0	g
Salt Solution	4.0	ml
Distilled water	100.0	ml
Glucose	1.0	g
L-Cysteine hydrochloride	0.05	g
Oxgall	2.0	g

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด เติม L-Cysteine hydrochloride เทใส่หลอดแก้วเล็ก 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 112 °ซ นาน 10 นาที

4.2.2 Broth Sugar มี base medium คือ peptone yeast extract broth (PY)

ส่วนผสม

Bacto-Peptone	0.5	g
Trypticase Soy Broth	0.5	g
Yeast Extract	1.0	g
Salt Solution	4.0	ml
Distilled water	100.0	ml
L-Cysteine hydrochloride	0.05	g

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด เติม L-Cysteine hydrochloride เติมคาร์โบไฮเดรต 18 ชนิด ได้แก่ glucose, sucrose, mannitol, fructose, maltose, xylose, lactose, salicin, rhamnose, raffinose, mannose, inositol, adonitol, starch, inulin, arabinose, esculin, trehalose เติมลงใน PY ให้เป็นร้อยละ 1 ส่วน arabinose, esculin, trehalose, เติมใน PY ให้เป็นร้อยละ 0.5 ดังตารางที่ 22 เขย่าให้เข้ากัน, เทใส่หลอดแก้ว ประมาณ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave 112 °ซ นาน 10 นาที

4.2.3 Gelatin

ส่วนผสม

Difco nutrient gelatin	15	g
Distilled water	100	ml
Finely powdered charcoal	3-5	g

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย จนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมผงถ่านผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็น และเทใส่จานอาหารเปล่าที่ทาด้วย glycerol ให้มีความหนา 3 มม. เทสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงบนมีเดียให้ท่วม ทิ้งไว้หลาย ๆ ชั่วโมง แล้วลอกแผ่น gelatin ที่ได้ไปแช่ในสารละลายฟอร์มาลิน นาน 24 ชั่วโมง ตัดแผ่น gelatin เป็นชิ้น ๆ ขนาด 1 x 0.5 ซม ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ sterile นานประมาณ 24 ชั่วโมง เก็บโคยแช่ในขวดที่มีน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปิดทับด้วย toluene ที่ sterile ซึ่งใช้เป็น preservative

ตารางที่ 22 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ base ต่าง ๆ กัน

SUMMARY TABLE FOR MEDIA PREP

base	substrate or medium	amt. in 100 ml	pH **	autoclave time (min)	available from***
PY	adonitol	0.5 g	6.9	15	NBC
– –	AMC *	*	6.9	15	– –
PY	amygdalin	0.5	6.9	15	Calbiochem, NBC
PY	arabinose (L)	0.5	6.9	12	BBL
PY	arginine	0.3	6.7	15	Calbiochem
– –	BHIA *	*	6.9	15	BBL
PYG	bile (oxgall)*	2.0	6.9	15	Difco, BBL
BHIA	casein *	*	6.9	15	Fisher
PY	cellobiose	1.0	6.9	15	Difco
– –	chopped meat [CM] *	*	7.0	30	– –
CM	CM-glucose *	*	7.0	30	– –
– –	dilution blanks *	*	6.6	15	– –
PY	dulcitol	1.0	6.9	15	BBL, Difco
– –	E *	*	6.3	25	– –
PY	erythritol (DL)	0.5	6.7	15	Sigma
PY	esculin [aesculin]	0.5	6.6	15	BBL, Difco
PY	fructose [levulose] (D)	1.0	6.9	15	Fisher, Difco
PY	galactose (D)	1.0	6.9	15	Difco
– –	gelatin *	*	6.9	15	– –
PY	glucose [PYG]	1.0	6.9	15	– –
– –	GMB *	*	6.9	15	– –
PY	glycerol	0.8 ml	6.7	15	Fisher
PY	glycogen	0.5 g	6.7	15	Fisher
PY	hippurate [Na-hippurate]	1.0	6.9	15	Difco
PY	inositol	1.0	6.9	15	Difco
PY	inulin	1.0	6.9	15	Difco
PY	lactate [lactic acid] *	*	6.9	15	NBC
PY	lactose	1.0 g	6.9	15	Fisher
PY	maltose (D+)	1.0	6.9	15	Difco
PY	mannitol (D)	1.0	6.9	15	Difco
PY	mannose (D+)	1.0	6.9	15	Difco
PY	melezitose	0.5	6.9	15	Difco
PY	melibiose	0.5	6.9	15	BBL, Difco
– –	milk *	*	7.1	12	– –
– –	nitrate *	*	6.6	15	BBL
– –	peptone yeast [PY]	*	6.9	15	– –
PY	pyruvate [pyruvic acid] *	*	6.9	12	Eastman
PY	raffinose (D+)	1.0 g	6.9	15	Difco
PY	rhamnose	1.0	6.9	15	BBL, Difco
PY	ribose (D-)	0.5	6.7	12	Eastman, Fisher
– –	RGCA *	*	6.3	25	– –
PY	salicin	1.0	6.9	15	BBL, Difco
– –	SIM *	*	6.0	15	BBL
PY	sorbitol (D)	1.0	6.9	15	Difco
PY	sorbose (L)	1.0	6.9	15	NBC
PY	starch-soluble	1.0	6.5	15	Difco
PY	sucrose [saccharose]	1.0	6.9	15	Difco
PY	threonine (DL)	0.3	6.7	12	NBC
PY	trehalose	0.5	6.9	15	Difco
PYG	tween-80 *	*	6.9	15	Baker
– –	tryptone yeast [TY] *	*	6.9	15	– –
PY	xylose (D)	1.0 g	6.7	12	Difco

* See medium formula in text. ** Represents pH of medium before autoclaving (after adjusting with NaOH and CO_2—see text). These pH values before autoclaving are satisfactory for preparation of media in our laboratory. They may have to be adjusted somewhat to give media with satisfactory pH when prepared in other laboratories under different conditions (different water, etc.). *** Substrates from other sources may be equally satisfactory.

4.2.4 H_2S medium

ส่วนผสม

SIM dehydrate medium	3.0	g
Yeast Extract	0.4	g
Resazurin solution	0.4	ml
Salt solution	50.0	ml
Distilled water	50.0	ml
Hemin solution	1.0	ml
Vitamin K_1	0.02	ml
Cysteine HCl.H_2O	0.05	g

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 50 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม Cysteine HCl.H_2O เทใส่หลอดแก้วประมาณ 4 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม VK-H 0.04 มล./หลอดแก้ว

4.2.5 Motility medium

ส่วนผสม

Motility medium (Gibco)	20	g
Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น เทใส่หลอดแก้วประมาณ 2 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

4.2.6 Nitrate medium

ส่วนผสม

Bacto beef extract	3	g
Bacto-Peptone	10	g
Sodium Chloride	5	g
Potassium nitrate	1	g
Distilled water	1000	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นจนละลายหมด เทใส่หลอดแก้วประมาณ 3 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

4.2.7 O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside broth (ONPG) (Lowe, 1962)

ส่วนผสมที่ 1

ONPG	6	g
0.01 M Na_2HPO_4	1000	ml

วิธีเตรียม

ละลาย ONPG (O-nitrophenyl-β-galacto-pyranoside) ใน phosphate solution ที่มีความเป็นกรด - ด่าง 7.5 ณ อุณหภูมิห้อง นำไปฆ่าเชื้อโดยการกรอง

ส่วนผสมที่ 2

Bacto-Peptone	0.5	g
Trypticase (Tryptone)	0.5	g
Yeast extract	1.0	g
Resazurin solution	0.4	ml
Salt solution	4.0	g
Distilled water	86.0	ml
Cysteine HCl	0.05	g
VKH	1.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม Cysteine. HCl, ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม VK-H 0.025 มล./หลอดแก้ว

วิธีการเตรียมอาหารก่อนการทดสอบ

ส่วนผสมที่ 1

ONPG solution	250	ml

ส่วนผสมที่ 2

Peptone Yeast Extract Broth (PY)	750	ml

วิธีเตรียม

เติม ONPG solution ใน PY broth แบบ aseptic เทใส่หลอดที่ sterile แล้ว หลอดละประมาณ 2.5 มล.

4.2.8 Peptone-Yeast Extract Broth (PY)

ส่วนผสม

Bacto-Peptone	0.5	g
Trypticase (Tryptone)	0.5	g
Yeast extract	1.0	g
Resazurin solution	0.4	ml
Salt solution	4.0	ml
Distilled water	86.0	ml
Cysteine .HCl	0.05	g
VKH	1.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม Cysteine. HCL, ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 เทใส่หลอดแก้วประมาณ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม VK-H 0.05 มล./หลอดแก้ว

4.2.9 Peptone-Yeast Extract Glucose Broth (PYG)

ส่วนผสม

Bacto-Peptone	0.5	g
Trypticase (Tryptone)	0.5	g
Yeast Extract	1.0	g
Resazurin solution	0.4	ml
Salt solution	4.0	ml
Distilled water	86.0	ml
Cysteine.HCl	0.05	g

VKH	1.0	ml
Glucose	1	g

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น เติม Cysteine. HCl, ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 เทใส่หลอดแก้วประมาณ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 112 °ซ นาน 10 นาที เติม VK-H 0.05 มล./หลอดแก้ว

4.2.10 Sodium hippurate solution, ความเข้มข้นร้อยละ 1

ส่วนผสม

Sodium hippurate	1	g
Distilled water (sterile)	100	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสม ใช้ไปเปตที่ปราศจากเชื้อดูดสารละลายใส่หลอดแก้วขนาด 10 x 75 มม. ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 0.2 มล. อุดด้วยสำลีที่ปราศจากเชื้อ

4.2.11 Starch Fermentation broth (Vera and Power, 1980)

ส่วนผสม

Solution A :

Heart Infusion Broth (Gibco)	0.125	g
Distilled water	200.0	ml
Gram crystal purple (BDH)	0.2	ml

(1.6% in methanol)

adjust pH to 7.8

Solution B :

Starch (Difco)	0.4	g
Distilled water	20.0	ml

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสม ต้มจนสารผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น แล้วผสม Solution A และ Solution B แล้วเทใส่หลอดแก้ว 4 มล. ขนาดหลอดแก้วจุกเกลียว 10 x 100 มม. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

4.2.12 <u>มีเดียสำหรับทำ CAMP test ของเชื้อ *Mobiluncus* คือ</u>

<u>Columbia blood agar, 4% sheep blood</u>

<u>ส่วนผสม</u>

Pancreatic Digest of Casein	10.0	g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0	g
Yeast Autolysate	5.0	g
Pancreatic Digest of Heart Muscle	3.0	g
Corn Starch	1.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	13.5	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดี และทิ้งให้เย็น ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3±0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่เลือดแกะร้อยละ 4 เทใส่จานอาหารเปล่า 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

อาหารทดสอบที่ใช้กับเชื้อ *G.vaginalis*

broth sugar (BS) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต 4 ชนิด ได้แก่ glucose, maltose, mannitol และ starch

Hippurate hydrolysis

4.2.13 Broth sugar

ส่วนผสม

Proteose peptone no. 3	2.0	g
Phenol red	0.002	g
Agar	0.5	g
Distilled water	990.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น และปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.1-7.2 เติม indicator แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 200 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติมคาร์โบไฮเดรต ที่ผ่านการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ glucose, maltose, mannitol และ starch แต่ละชนิดลงใน PY ให้เป็นร้อยละ 1 เขย่าให้เข้ากัน จึงเทใส่หลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อแล้วประมาณ 2 มล.

4.2.14 Sodium hippurate solution,ความเข้มข้นร้อยละ 1

ส่วนผสม

Sodium hippurate	1	g
Distilled water (sterile)	100	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสม ใช้ไปเปตที่ปราศจากเชื้อดูด สารละลายใส่หลอดแก้วขนาด 10 x 75 มม. ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 0.2 มล. อุดด้วยสำลีที่ปราศจากเชื้อ

5. มีเดียทดสอบ MIC

5.1 มีเดียทดสอบ MIC สำหรับ *Mobiluncus*

5.1.1 Columbia blood agar base supplement ด้วยซีรัมของม้าร้อยละ 2.5 (Skarin et al. 1983)

ส่วนผสม

Pancreatic Digest of Casein	10.0	g
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0	g
Yeast Autolysate	5.0	g
Pancreatic Digest of Heart Muscle	3.0	g
Corn Starch	1.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Agar	13.5	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดี และทิ้งให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ซีรัมของม้าร้อยละ 2.5 เทใส่อาหารเปล่า ที่มีสารละลายยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันอยู่ 2 มล. ใส่มีเดีย 18 มล. รวมเป็น 20 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

5.1.2 Brain-Heart Infusion Broth-Supplement (BHIB) (Holdeman et al. 1974)

ส่วนผสม

Brain Heart Infusion Broth (dehydrate)(BBL)	3.7	g
Yeast Extract	0.5	g
Distilled water	100.0	ml
L-Cysteine HCl.H_2O	0.05	g
Rasazurin solution	0.4	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดี และทิ้งให้เย็น แล้วเติม L-Cysteine HCl.H_2O 0.05 กรัม, แบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวหลอดละ 5 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม Vk-H 0.05 มล./หลอดแก้ว

5.2 มีเดียทดสอบ MIC สำหรับ *G. vaginalis* คือ

5.2.1 Chocolate medium (CA)

ส่วนผสม

Proteose Peptone No.3, Difco	15	g
Corn Starch	1	g
Potassium Phosphate, Dibasic	4	g
Potassium Phosphate, Monobasic	1	g
Sodium Chloride	5	g
Bacto Agar	10	g
Distilled water	500	ml
Isovitalex	1%	

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดี ทิ้งให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เติมเลือดแกะร้อยละ 5 และเซย่าให้เลือดแตกใน Water bath 100 °ซ ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ Isovitalex enrichment (BBL) ร้อยละ 1 แล้วใส่จานอาหารเปล่าที่มีสารละลายยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันอยู่ 2 มล. ใส่มีเดีย 18 มล. รวมเป็น 20 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

5.2.2 Trypticase soy broth (TSB) (BBL)

ส่วนผสม

Pancreatic Digest of Casein	17.0	g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Dipotassium Phosphate	2.5	g
Dextrose	2.5	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น7.3 ± 0.2 แล้วใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 2 มล.นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

6. มีเดียเก็บเชื้อ

6.1 มีเดียเก็บเชื้อ *Mobiluncus*

6.1.1 Skim milk (Double strength)

ส่วนผสม

Skim milk (Difco)	20	g
Distilled water	100	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Skim milk ลงในน้ำกลั่น 100 มล.ใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มล.หลอดละ 5 มล.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยautoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

6.1.2 Cooked meat medium (CM medium)

ชั่งอาหาร 12.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จนกระทั่งชิ้นเนื้อเปียกน้ำโดยทั่วถึง เติมResazurin solution 0.4 มล., L-Cysteine HCl.H_2O 0.05 กรัมแบ่งใส่หลอดแก้วฝาเกลียวโดยมีชิ้นเนื้อ 1 ส่วน อาหารเหลว 4-5 ส่วน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ก่อนใช้เติม VK-H 0.05 มล./หลอดแก้ว

6.2 มีเดียเก็บเชื้อ *G.vaginalis*

Trypticase soy broth ที่เติมfetal bovine serum ร้อยละ 2

ส่วนผสม

Pancreatic Digest of Casein	17.0	g
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0	g
Sodium Chloride	5.0	g
Dipotassium Phosphate	2.5	g
Dextrose	2.5	g
Distilled water	1000.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มล. ต้มจนส่วนผสมละลายหมด ปล่อยให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.4± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ เติม fetal bovine serum ร้อยละ 2 เทใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มล.ที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 3 มล. แช่เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ

7. มีเดียสำหรับทำ flagella stain ของเชื้อ *Mobiluncus*

7.1 CDC anaerobe blood agar (Koneman et al.1979)

ส่วนผสม

Yeast extract	0.5	g
Trypticase soy agar	4.0	g
Distilled water	100.0	ml

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น 100 มล. ต้มให้เดือด ปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.3-7.5 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45-50 °ซ เติม Vitamin K-hemin solution ปริมาณ 1 มล. และเติม defibrinated rabbit หรือ sheep blood ปริมาณ 5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานอาหารเปล่า

8. มีเดียสำหรับทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *G.vaginalis*

8.1 มีเดียสำหรับทำการทดสอบความไวของยา Metronidazole คือ

Peptone Starch Dextrose Agar (PSD)(Qunkeltery et al. 1970)

ส่วนผสม

Proteose Peptone No.3	20	g
Soluble starch	10	g
Dextrose	2	g
Na_2HPO_4	1	g
$NaH_2PO_4.H_2O$	1	g
Agar	15	g

วิธีเตรียม

เท starch ในน้ำกลั่น 50 มล. เขย่าให้เข้ากัน เทลงในน้ำกลั่นต้มเดือด 200 มล. เขย่าให้เข้ากัน ละลายส่วนผสมอื่น ๆ ให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นอีก 250 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที เทใส่จานอาหารว่าง 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

8.2 มีเดียสำหรับทำการทดสอบความไวของยา Trimethoprim คือ

H agar

ส่วนผสม

CNA agar	21	ml
Amphotericin B	2	µg/ml
5% human blood		

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสม CNA agar ในน้ำกลั่น ต้มจนละลายดีและทิ้งให้เย็น ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 50 °ซ จึงใส่ Amphotericin B 2 ไมโครกรัม/มล., เลือดคนร้อยละ 5 เทใส่จานอาหารเปล่า 15 มล. อบผิวหน้าให้แห้ง

ภาคผนวก จ

น้ำยาทดสอบ

1. สารเคมีที่ใช้ทดสอบเชื้อ *Mobiluncus*

1.1 Cytochrome oxidase reagents

1. 1% naphthol solution เตรียมโดยการใช้สาร alpha-naphthol 1 กรัม ละลายใน absolute alcohol 100 มล.

2. Phenylene-diamine solution เตรียมโดยการใช้ N,N,- diamethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าเก็บในตู้เย็น

1.2 Ehrlich's reagent

ส่วนผสม

para-dimethyl-amino-benzaldehyde	2	g
Ethly alcohol, 95%	190	ml
HCl conc.	40	ml

วิธีเตรียม

ละลาย aldehyde ใน alcohol แล้วจึงนำไปผสมกับ HCL conc.

1.3 Ferric ammonium citrate, ความเข้มข้นร้อยละ 1

ส่วนผสม

Ferric ammonium citrate	1	g
Distilled water	100	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Ferric ammonium citrate ในน้ำกลั่น 100 มล.

1.4 Hydrogen peroxide, ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 10

ส่วนผสม

H_2O_2, ความเข้มข้นร้อยละ 30

Distilled water

วิธีการเตรียม

ผสม Hydrogen peroxide กับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 10 ตามลำดับ

1.5 Lugol's solution

ส่วนผสม

Iodine	5	g
Potassium iodide	10	g
Distilled water	100	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Potassium iodide และ Iodine ในน้ำกลั่น 10 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้เป็น 100 มล. เวลาจะใช้นำมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า

1.6 Methyl red solution

ส่วนผสม

Methyl red	0.04	g
Ethanol	40.0	ml
Distilled water	100.0	ml

วิธีเตรียม

ละลาย methyl red ใน ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้มีปริมาตร 100 มล.

1.7 Nitrate test reagents

Solution A

ส่วนผสม

Sulfanilic acid	1	g
Acetic acid (5 N aqueous solution)	125	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Sulfanilic acid อย่างช้า ๆ ลงใน acetic acid จนหมด

Solution B

ส่วนผสม

dimethyl-alpha-naphthylamine	1.2	ml
Acetic acid (5N aqueous solution)	100.0	ml

วิธีเตรียม

ละลาย naphthylamine ลงใน acetic acid อย่างช้า ๆ

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อม negative stain สำหรับการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน

2.1 Primary fixative ประกอบด้วย

Glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2	16	ml
0.1 M Phosphate buffer pH 7.4	50	ml
Distilled water	34	ml

วิธีเตรียม

ผสมส่วนประกอบข้างต้นใน hood ใส่ในขวดที่หุ้มกระดาษตะกั่วและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

2.2 สีย้อม คือ Phosphotungstic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

3. สารเคมีมาตรฐานของ short chain fatty acid (Standard SCFAs) (Skoog and West, 1969)

ความเข้มข้นของ SCFAs อยู่ในหน่วย milliequivalent per 100 มล.(mEq/คล.)

equivalent เป็นหน่วยความเข้มข้นของสารละลายที่หารน้ำหนักของสารซึ่งอยู่ในสารละลาย (กรัม) ด้วย equivalent weight

$$Eq = mEq \times 1000 = \frac{\text{น้ำหนักของมวลสาร}}{\text{eq.wt.}}$$

eq.wt. เท่ากับน้ำหนักโมเลกุล (GMW) ที่หารด้วย valency ของสารชนิดเดียวกัน

valency จะเป็นตัวเลขของไฮโดรเจนอะตอมหรือไฮดรอกซีอะตอม

ของสาร

$$mEq = \frac{\text{น้ำหนักของมวลสาร (กรัม) x 1000 x วาเลนซี่}}{\text{น้ำหนักโมเลกุล}}$$

น้ำหนักของ standard acid ให้ได้หน่วย 1 mEq/คล.ใช้สูตร

$$\text{น้ำหนักของมวลสาร (กรัม)} = \frac{mEq \times \text{น้ำหนักโมเลกุล}}{1000 \times \text{วาเลนซี่}}$$

ถ้า standard acid อยู่ในรูปสารละลายวิธีการคำนวณโดยกฎธรรมดาทางคณิตศาสตร์ ดังตัวอย่าง

1.049 กรัม of std Acetic acid = 1 มล.

0.06005 กรัม " " = $\frac{0.06005}{1.049}$

= 0.057 มล.

Standard SCFAs solution

Working standard ของ SCFAs คือ 1 mEq/คล. เตรียมดังนี้ โดยชั่งน้ำหนักของ standard acid แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น และเติมให้ครบ 100 มล. ถ้าstandard acid เป็นน้ำให้เติมน้ำให้ครบ 100 มล. น้ำหนักโมเลกุล, วาเลนซี่ น้ำหนักของ 1 มล. standard acid, wt. of std. SCFAs (กรัม) และ ปริมาตร ของ standard SCFAs ที่เติมเป็น 100 มล. ของ working standard แสดงในตารางดังนี้

SCFAs	mEq	น้ำหนักโมเลกุล	วาเลนซี่	น้ำหนักของมวลสาร (กรัม)
VFAs				
acetic acid	1	60.05	1	0.06005
NVFAs				
lactic acid (85%)	1	90.08	1	0.09000
succinic acid	1	118.09	2	0.06000

SCFAs	น้ำหนักของมวลสาร (กรัม)	1 มล.ของกรดเท่ากับ น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตรของกรดที่ใช้ (มล.)
VFAs acetic	0.06005	1.049	0.057
NVFAs lactic(85%)	0.09000	1.210	0.074

Internal standard

1 mEq/คล.ของ isopropanol ใช้เป็น internal standard ของ VFAs

1 mEq/คล.ของ benzoic acid ใช้เป็น internal standard ของ NVFAs

สารเคมีสำหรับการสกัดสาร SCFAs (Chemical solution for extraction of SCFAs)

1. Chloroform
2. Diethyl ether
3. H_2SO_4 ความเข้มข้นร้อยละ 50
4. Methanol
5. NaCl
6. Na_2SO_4 (anhydrous)

4. Test paper

4.1 Lead acetate paper

วัสดุ

lead acetate

กระดาษกรอง whatman No. 1

วิธีเตรียม

ละลาย lead acetate ให้อิ่มตัวด้วยน้ำกลั่น ตัดกระดาษ whatman No.1 ที่ตัดได้ขนาด 5 x 1 ซม. นำไปแช่ในน้ำยา นาน 2-4 ชั่วโมง สลัดให้หมาดใส่ในจานอาหารเปล่า อบที่ 42 °ซ ห่อจานอาหารดังกล่าวด้วยกระดาษตะกั่ว หลาย ๆ ชั้น นำไปอบฆ่าเชื้อ 121 °ซ นาน 15 นาที

4.2 Metronidazole 50 ไมโครกรัม/แผ่นยา

1. แผ่นยาเปล่าที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.65 mm.
2. Metronidazole solution

ส่วนผสมของ Metronidazole solution (stock solution)

Metronidazole	2.5	mg
(Siam Bheasach Co., Ltd.)		
Distilled water	2.5	ml

วิธีการทดสอบการดูดซึมของแผ่นยา ทำดังนี้

ใส่แผ่นยาเปล่าลงในน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มล. เรื่อย ๆ จนได้จำนวนแผ่นยาที่สามารถอมน้ำได้หมด เท่ากับ 50 แผ่น

วิธีการเตรียม

แช่แผ่นยาเปล่า 50 แผ่น ลงใน working solution คำนวณแล้วว่ามียา Metronidazole 50 ไมโครกรัม/แผ่นยา ดังนี้

แผ่นยาเปล่า 50 แผ่นสามารถจุยาMetronidazole 2.5 ml

" 1 " "$\frac{2.5 \times 1}{50}$

= 50 µl

แผ่นยาเปล่าสามารถจุยาได้ 50 ไมโครลิตร/แผ่นยา

ต้องการแผ่นยาMetronidazole 50 ไมโครกรัม/แผ่นยา

สรุปว่าแผ่นยา 50 แผ่นสามารถจุยา Metronidazole ได้เท่ากับ 50x50 = 2500 ไมโครกรัม (2.5 มก.) โดยละลายยาในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 2.5 มล.

4.3 Trimethoprime 5 ไมโครกรัม/แผ่นยา

ส่วนผสม Trimethoprime solution (stock solution)

Trimethoprime	0.25	mg
Distilled water	2.5	ml

วิธีเตรียม

แช่แผ่นยาเปล่า 50 แผ่นลงใน working solution ของ Trimethoprime ปริมาตร 2.5 มล.ที่มีเนื้อยา Trimethoprim อยู่ 0.25 มก. (250 ไมโครกรัม) วิธีการคิดเช่นเดียวกับการเตรียมแผ่นยา Metronidazole

5. การเตรียม Mc Farland nephelometer barium sulfate standard No. 1 (Sutter et al. 1980)

ส่วนผสม

Barium chloride, 1% aqueous	0.1	ml
Sulfuric acid, 1% aqueous	9.9	ml

วิธีเตรียม

ใช้สารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 0.1 มล. เติมลงในสารละลายกรดซัลฟุริคความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 9.9 มล. เติมใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 x 15 มล. ปิดให้แน่น เก็บไว้ได้นาน 6 เดือน ก่อนใช้นำมาเขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer

ความขุ่นเทียบเท่า Mc Farland's standard No.1 คือ จำนวนบัคเตรี 3 x 10^8 เซลล์/มล.

6. การเตรียม Mc Farland nephelometer barium sulfate standard No. 0.5 (Lennette, 1980 : 469, Sutter and other, 1980 : 10^3)

0.048 M $BaCl_2$ (1.75% w/v $BaCl_2 . 2H_2O$)	0.5 มล.
0.18M H_2SO_4 (1% v/v)	99.5 มล.

ความขุ่นเทียบเท่า Mc Farland's standard No. 0.5 คือจำนวนบัคเตรี 1.5 x 10^7 เซลล์/มล.

7. Potassium hydroxide, ความเข้มข้นร้อยละ 10

ส่วนผสม

Potassium hydroxide	10	g
Glycerin	10	ml
Distilled water	80	ml

วิธีเตรียม

ละลาย Potassium hydroxide ใน glycerin และน้ำกลั่น

ภาคผนวก ฉ

แบบสอบถาม

Study No. ○○○

เลขที่ทั่วไป ○○○○○○

ชื่อ

ที่อยู่

อายุ ..... ปี

มีโรคประจำตัวหรือไม่

○ ไม่มี

○ มี โรค ..... ○

ขณะนี้กำลังกินยาอะไรหรือไม่

○ ไม่ได้กิน

○ ยาแก้ปวด

○ ยาปฏิชีวนะ

○ ฮอร์โมน

○ ยาสเตียรอยด์

○ อื่น ๆ ○

ปัจจุบันคุมกำเนิดหรือไม่

○ ไม่ได้คุม

○ กินยาชื่อ

○ ฉีดยา

○ อื่น ๆ ○

<u>ประวัติการศึกษา</u>

ผู้ป่วย ○ อ่านและเขียนไม่ได้ ○ อ่านได้เขียนได้

○ จบประถมศึกษา 4 ○ จบมัธยมต้น

○ จบมัธยมปลาย ○ จบอาชีวะ

○ จบปริญญา ○

สภาพสมรสและจำนวนบุตร

สภาพสมรส ○ โสด ○

○ คู่

จำนวนบุตร ..... คน

<u>เศรษฐานะ</u>

อาชีพ ○ แม่บ้าน รายได้ ..... บาท/เดือน

○ ค้าขาย ..... บาท/เดือน

○ รับราชการ ..... บาท/เดือน

○ พนักงานรับจ้าง ..... บาท/เดือน

○ เสมียน, พนักงานพิมพ์ดีด ..... บาท/เดือน

○ ลูกจ้างรายเดือน ..... บาท/เดือน

○ กรรมกรรายวัน ..... บาท/เดือน

○ หญิงบริการ ..... บาท/เดือน

○ อาชีพไม่เป็นหลัก ..... บาท/เดือน ○

สามี อายุ ..... ปี

○ รับราชการ รายได้ ..... บาท/เดือน

○ รับเหมาก่อสร้าง ..... บาท/เดือน

○ ค้าขาย ..... บาท/เดือน

○ พนักงานรับจ้าง ..... บาท/เดือน

○ เสมียน, พนักงานพิมพ์ดีด ..... บาท/เดือน

○ ลูกจ้างรายเดือน ..... บาท/เดือน

○ กรรมกรรายวัน ..... บาท/เดือน

○ อาชีพไม่เป็นหลัก ..... บาท/เดือน ○

ประวัติเพศสัมพันธ์

ท่านเคยเป็นโรคทางเพศสัมพันธ์หรือไม่

○ ไม่เคย

○ เคย โรค ..... ○

ถ้าเคย ทำไมจึงทราบ

○ สามีไปตรวจแล้วว่าเป็น

○ ตัวเองตรวจพบ

ประวัติการเจ็บป่วยปัจจุบัน

○ ตกขาว ○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

○ กลิ่นผิดปกติ ○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

○ คัน ○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

○ บัสสาวะแสบ ○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

○ เจ็บขณะร่วมเพศ ○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

○ เลือดออกภายหลังร่วมเพศ

○ ไม่มี

○ มี ..... วัน ○

การรักษาก่อนมาตรวจครั้งนี้ ○ ไม่เคย ○

○ เคย ..... วัน ○○

ถ้าเคยรักษาได้ปฏิบัติอย่างไร

- ○ ซื้อยารักษาเอง
- ○ สามีซื้อยาให้
- ○ ไป ร.พ. บางรัก
- ○ ไป ร.พ. รัฐบาล
- ○ ไป ร.พ. เอกชน
- ○ ไปคลินิค

ประวัติผู้เขียน

นางสาว วิภา ตรีรัตนวีรพงษ์ เกิดปี พ.ศ.2499 จ.กรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เมื่อปี พ.ศ. 2523 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย