
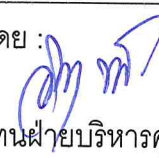




บริษัท นอร์ทเทอรัน ฟู้ด คอมเพล็กซ์ จำกัด

วิธีการปฏิบัติงาน	เรื่อง คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Staphylococcus ยี่ห้อ Biomerieux	หน้า 1 ของ 1
รหัสเอกสาร : SP-QC-98	วันที่ประกาศใช้ : 26 กรกฎาคม 2562	แก้ไขครั้งที่ : 00
จัดทำโดย : ดร.ดร. หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ	ทบทวนโดย :  ผู้จัดการฝ่ายวางแผนและควบคุมการผลิต	อนุมัติโดย :  ตัวแทนฝ่ายบริหารคุณภาพ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด

SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ๙ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



Certificate Number TH03/2708



Certificate Number TH00/2709



1. วัตถุประสงค์

สำหรับเป็นคู่มือปฏิบัติงานให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการทดสอบเชื้อ coagulase positive staphylococci โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar with RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) โดยไม่ต้องทำการ Confirmation

2. ขอบข่าย

วิธีการปฏิบัติงานนี้ครอบคลุมการทดสอบหาเชื้อ coagulase positive staphylococci ในตัวอย่างอาหารคน และตัวอย่างอาหารสัตว์ ที่วิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ

3. อ้างอิง

- 3.1 ISO 6888-2: 1999, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -- Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium
- 3.2 คู่มือการใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF Agar (RPFA)

4. คำนิยาม และหลักการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF Agar (RPFA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยสารอาหารมากมายที่เหมาะสมกับการคัดเลือกเชื้อ Staphylococci coagulase+ โดยส่วนประกอบหลักต่างๆ ได้แก่ glycine และ sodium pyruvate มีส่วนกระตุ้นให้เชื้อที่ได้รับบาดเจ็บมีการฟื้นฟู และซ่อมแซมเซลล์ ทำให้เจริญได้ดี ,lithium chloride และ potassium tellurite เป็นตัวที่คัดเลือกสายพันธุ์ Staphylococci coagulase+ ทำให้เกิดลักษณะโคโลนีสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังมี rabbit plasma and bovine fibrinogen ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิด coagulation และ trypsin inhibitor ช่วยในการเกิด Halo หรือ โชนสีขาวขุ่น รอบโคโลนี

5. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1 เครื่องชั่ง ชั่งได้ละเอียดถึง 0.1 กรัม และ 0.01 กรัม
- 5.2 Stomacher และ Stomacher bag
- 5.3 Inoculating needle และ Inoculating loop
- 5.4 ข้อน กรรไกร และ forceps ปลอดเชื้อ
- 5.5 ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร
- 5.6 Incubator $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5.7 Incubator $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาริต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



- 5.8 เครื่อง water-baths ที่ตั้งอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 50 – 95 °C
- 5.9 เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่ 44 – 47 °C
- 5.10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบปลอดเชื้อ

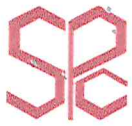
6. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 6.1 Buffer Peptone water
- 6.2 Peptone Salt Solution
- 6.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF agar (BP RPF)
 - 6.3.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 6.3.1.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาจากตู้เย็น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
 - 6.3.1.2 คลายฝาขวด ให้หลวมเล็กน้อย
 - 6.3.1.3 วางขวดอาหารเลี้ยงเชื้อลงในเครื่อง water-baths ที่ตั้งค่าอุณหภูมิประมาณ 50°C จากนั้น จึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 95 °C และตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งละลาย (ประมาณ 45 นาที)
 - 6.3.1.4 หมุนฝาขวดปิดกลับ (สวมถุงมือเพื่อป้องกันความ ร้อน) และ ทำการ เช้าเบาๆ ให้เข้ากัน
 - 6.3.1.5 ตั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาทีก่อนนำไปตั้งไว้ใน เครื่อง water-baths ที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิที่ 44 - 47°C จนกว่าจะใช้งาน
 - 6.3.1.6 สำหรับ Supplement (R2) ให้เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 ml. ผสมให้ เข้ากัน
 - 6.3.1.7 นำขวดอาหาร R2 ที่ผสมแล้วไป pre-heat ที่อุณหภูมิ 37°C
 - 6.3.1.8 จากนั้นนำอาหารจากขวด R2 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขวด R1 แล้วผสมให้เข้า กัน พร้อมนำไปใช้งาน

7. การควบคุมคุณภาพ

- 7.1 การทำ QC Air Sampling บริเวณที่วิเคราะห์ โดยกำหนดไม่เกิน 15 โคโลนี/เพลท/15 นาที
- 7.2 อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบต้องเป็นอุปกรณ์ปลอดเชื้อทั้งหมด รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ใน การเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบด้วย
- 7.3 ในทุกขั้นตอนของการทดสอบต้องใช้ Aseptic technique
- 7.4 ระวังเรื่อง การปนเปื้อนและการปนเปื้อนข้ามของจุลินทรีย์

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาริต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ๑0260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd. Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



8. ขั้นตอนการวิเคราะห์

8.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่างอย่างน้อย 25 กรัม แล้วเติม Peptone Salt Solution

(หรือ Sterile Diluent อื่นๆ) ในอัตราส่วน 1: 9 (หรือ 225 มิลลิลิตร)

8.2 ตีบดผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ด้วยเครื่องตีบด ผสมตัวอย่าง

8.3 บีบตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อ

8.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF agar (BP RPF) ที่มีอุณหภูมิ 44-47 องศา

เซลเซียส ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร

8.5 ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้จนอาหารแข็ง

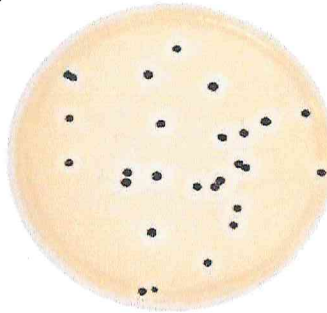
8.6 คั่วเพลท และนำเข้าบ่มที่ตู้บ่ม 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีโคโลนี ไม่ชัดเจนให้บ่ม ต่ออีก เป็น 48 ชั่วโมง

8.1.1.7 อ่านผลลักษณะ Typical colony ที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี (โคโลนีรวมทั้งหมด ไม่เกิน 300 โคโลนี)

9. การอ่านผลการทดสอบ

อ่านลักษณะโคโลนี

- โคโลนีสีเทา-ดำ รอบๆมีโซนสีขาวขุ่น



10. การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลในหน่วยของ CFU ต่อตัวอย่างกรัม หรือ มิลลิลิตร

11. การเก็บรักษา

11.2 เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 2-8°C

11.2 หลีกเลี้ยงไม่ให้สัมผัสกับแสงโดยตรง

ต้นฉบับ

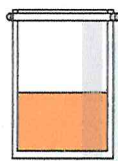


บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd. Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



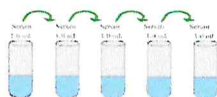
Flow Chart ISO 6888-2



ชั่งตัวอย่าง จำนวน 25 กรัม เติม sterile 0.1% peptone water 225 มิลลิเมตร



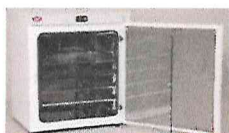
นำไปตีปั่นด้วยเครื่อง Blender เป็นเวลา 2 นาที



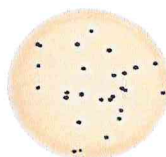
ทำ serial dilution ตามความเหมาะสม



ใช้ปิเปตหลอดเชื้อดัดตัวอย่างของแต่ละ dilution มาทำการ Pour plate



นำเพลทไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 37 °C เป็น เวลา 24-48 ชั่วโมง



นำเพลทออกมาอ่านผล นับ Typical colony คือโคโลนีสีดำ รอบๆมีโซนสีขาวขุ่น



Calculation

ต้นฉบับ



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมาสถิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF (BP RPF)

คล้ายฝาเกลียวของขวดอาหาร R1
และนำไปหลอมในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ
(ประมาณ 45 นาที)



หมุนฝาเกลียวกลับคืนและเขย่าให้เข้ากัน



ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาที ก่อนนำไปวางไว้ในอ่างน้ำร้อน
ที่มีอุณหภูมิ 47 ± 2 จนกว่าจะใช้งาน
(อ้างอิงจากมาตรฐาน ISO 11133-1 ได้แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 4 ชั่วโมง)



เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 ml. ลงในขวด R2 และผสมให้เข้ากันจนละลายหมด
(นำไป Pre-heat สักครู่ที่อุณหภูมิ 37°C)



เทสารละลายจากขวด R2 ทั้งหมดลงไปขวด R1 และผสมให้เข้ากัน



อาหาร Baird Parker RPF นี้ควรนำไปใช้งานทันที



บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาริต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ ๑๐๒๖๐
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



Certificate Number TH03/2708



Certificate Number TH00/2709



ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF (BP RPF)

คล้ายฝาเกลียวของขวดอาหาร R1
และนำไปหลอมในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ
(ประมาณ 45 นาที)



หมุนฝาเกลียวกลับคืนและเขย่าให้เข้ากัน



ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 15 วินาที ก่อนนำไปวางไว้ในอ่างน้ำร้อน
ที่มีอุณหภูมิ 47 ± 2 จนกว่าจะใช้งาน
(อ้างอิงจากมาตรฐาน ISO 11133-1 ได้แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 4 ชั่วโมง)



เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 ml. ลงในขวด R2 และผสมให้เข้ากันจนละลายหมด
(นำไป Pre-heat สักครู่ที่อุณหภูมิ 37°C)



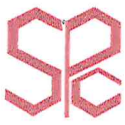
เทสารละลายจากขวด R2 ทั้งหมดลงไปในขวด R1 และผสมให้เข้ากัน



อาหาร Baird Parker RPF นี้ควรนำไปใช้งานทันที

Prepared by Karn Chakbutr

ต้นฉบับ

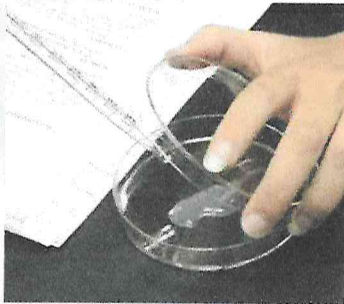


บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด
SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD

1759 ซอยวชิรธรรมสาธิต 57 ถนนสุขุมวิท 101/1 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพฯ 10260
1759 Soi Wachirathamsathit 57 Sukhumvit 101/1 Rd., Bangchak Prakanong Bangkok 10260 Thailand
Tel. 0-2185-4333 Fax. 0-2331-8809 Email : info@spcgroup.co.th Website : www.spcgroup.co.th



ขั้นตอนการใช้งานและการอ่านผลการทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker RPF



ดูดตัวอย่างทดสอบปริมาตร 1 ml.
ลงในเพลทเปล่า โดยแนะนำให้ทำ
2 เพลทต่อ 1 ระดับของการเจือจาง

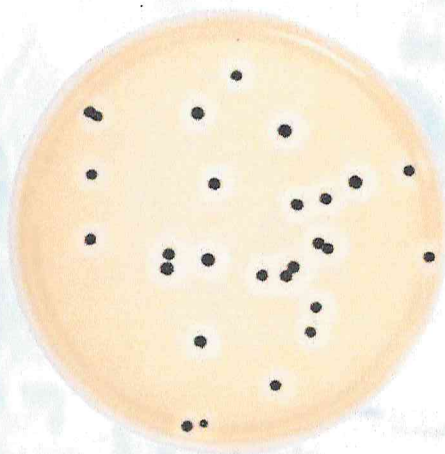


เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker
RPF ที่ได้หลอมละลายแล้วลงไป
ในเพลท ทำให้เข้ากันและทิ้งไว้
จนอาหารแข็งตัวดี



นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$
เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (หากไม่
พบ Typical colony สามารถเพิ่ม
เวลาบ่มได้อีก 18-24 ชั่วโมง)

การอ่านผลการทดสอบ



เชื้อ Coagulase-positive *Staphylococci* จะ
ให้ลักษณะโคโลนีสีเทา-ดำ และมีโซนชุ่น
ล้อมรอบ (ตามรูป) ทำการนับโคโลนีของเชื้อ
และหารด้วยปริมาตรของตัวอย่าง เพื่อให้ได้
จำนวนเชื้อ Coagulase-positive
Staphylococci ต่อกรัมของตัวอย่าง

ต้นฉบับ