ภาคผนวก ก

1. วิธีเตรียม Ringer ' solution

NaCl	90	กรัม
$CaCl_2$	2	กรัม
KCl	2	กรัม

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เมื่อจะใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1:10 แล้วจึงนำไปใช้

2. วิธีเตรียม PBS pH 7.4

ต้องเตรียมสารละลายต่างๆ ดังนี้

วิธีเตรียมสารละลาย 0.85% NSS

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม M/15 KH_2PO_4

KH_2PO_4	9.07	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม M/15 Na_2HPO_4

Na_2HPO_4	9.46	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม PBS pH 7.4 นำสารละลายที่เตรียมไว้ทั้งหมดมารวมกันตามปริมาตรดังนี้

0.85% NSS	500	มิลลิลิตร
M/15 KH_2PO_4	410	มิลลิลิตร
M/15 Na_2HPO_4	90	มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดมารวมกัน นำไปปรับค่า pH ให้ได้ pH 7.4 นำไปเข้า autoclave เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ

3. วิธีเตรียมแป้งข้าวเจ้า

นำแป้งข้าวเจ้า ประมาณ 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดที่มีฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปิดฝาหลวมๆ แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยเข้าตู้อบแห้งอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Boeck-Drbohlav

ผสมไข่ไก่ 4 ฟอง กับสารละลาย Ringer จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำหลอดทั้งหมดไปนึ่งในน้ำเดือด ประมาณ 5 นาที จนไข่แข็งตัว โดยวางหลอดให้เอียงประมาณ 30 องศา เมื่อไข่สุกผิวหน้าอาหารจะได้เอียงเป็น slant แล้วเติม PBS (pH) 7.4 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดอาหาร จำนวน 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝาเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อต้องการใช้นำออกจากตู้เย็นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนหลอดอาหารมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

เมื่อใช้เพาะเลี้ยงโปรโตซัวในลำไส้ใส่ซีรั่ม (calf bovine donor serum) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร, ยา penicillin G sodium (ความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จำนวน 50 ไมโครลิตร และ ยา streptomycin sulphate (ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 50 ไมโครลิตร แต่เมื่อใช้เพาะเลี้ยง *E. histolytica* ให้เติมแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 25 มิลลิกรัม เมื่อเติมส่วนประกอบทั้งหมดแล้วควรใช้ทันที

ภาคผนวก ข

1. การตรวจนับจำนวนเชื้อโดย counting chamber (haemocytometer)

1. ใช้ counting chamber และ cover slip ที่สะอาดไม่มีรอยขีดข่วน นำ cover slip วางบน counting chamber
2. ใช้ pasteur pipette ดูด suspension ขึ้น-ลงหลายๆ ครั้งจนผสมกันจนทั่วหลอด แล้วใช้ pasteur pipette ดูด suspension นั้นขึ้นมา จากนั้นนำปลาย pasteur pipette แตะขอบๆ ช่องว่างระหว่าง counting chamber กับ cover slip ค่อยๆ ปล่อย suspension จนเต็มพื้นที่ของ counting chamber
3. นำ counting chamber ไปตรวจนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10× โดยตรวจนับบริเวณ 4 ช่องใหญ่ของ counting chamber บันทึกการตรวจนับ

2. การคำนวณจำนวนเชื้อจาก counting chamber

ปริมาตรของ counting chamber ที่ใช้ในการตรวจนับทั้งหมด 4 ช่องใหญ่

ปริมาตรของ counting chamber 1 ช่องใหญ่ $= 1 \times 1 \times 0.1$ มิลลิเมตร

$= 0.1$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ปริมาตรของ counting chamber 4 ช่องใหญ่ $= 0.1 \times 4$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

$= 0.4$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

$\therefore$ เมื่อในปริมาตรทั้งหมด 0.4 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับจำนวนเชื้อได้ A เซลล์ นั่นคือ

ปริมาตร 0.4 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับจำนวนเชื้อได้ $= A$

ปริมาตร 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับจำนวนเชื้อได้ $= A \times \frac{1000}{0.4}$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

จำนวนเชื้อที่นับได้ $= 2500\ A$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร