10.14457/KKU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. แผนการวิจัย

รูปแบบการวิจัยใช้วิธีวิจัยเชิงวิเคราะห์ ณ จุดเวลาหนึ่ง (cross-sectional study) สำหรับการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยแบ่งการวิจัยออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

1.1 ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่าง

1.1.1 การสุ่มตัวอย่าง

1.1.2 การเก็บตัวอย่าง

1.1.2.1 กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต (กลุ่มที่ 1)

1.1.2.2 กลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต (กลุ่มที่ 2)

1.2 ขั้นตอนในการเพาะเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

1.2.1 การฟื้นกลับคืนและเพิ่มจำนวนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

1.2.2 การเพิ่มจำนวนและคัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เพื่อการพิสูจน์เชื้อ

1.3 ขั้นตอนในการทดสอบยืนยันพิสูจน์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

1.3.1 การทดสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

1.3.2 การทดสอบโดยการย้อมสีแกรม

1.3.3 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

1.4 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้สถิติ

2. อุปกรณ์ เครื่องมือ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการทำวิจัย

2.1.1 ตู้บ่มเชื้อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 37 – 42 องศาเซลเซียส

2.1.2 อ่างน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส

2.1.3 กล้องจุลทรรศน์

2.1.4 ตาชั่งสำหรับชั่งสารที่มีความละเอียด 0.1 กรัม (Sartorius,™ TE612)

2.1.5 จานสำหรับเลี้ยงเชื้อพร้อมฝาครอบ (steriled petri dishes)

2.1.6 ไปเปต (steriled pipettes) ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร

2.1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์

10.14457/KKU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

2.1.8 หลอดทดลอง (steriled test tube) ขนาด 5 และ 20 มิลลิลิตร

2.1.9 บีกเกอร์ตวงสาร ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

2.1.10 สำลีนึ่งฆ่าเชื้อโรคสำหรับการป้ายเชื้อ

2.1.11 Gas package สำหรับเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ (BBL™, GasPak™ USA)

2.1.12 แผ่นสไลด์แก้วขนาด 1 x 1 x 0.2 ตารางเซนติเมตร

2.1.13 ลูปโลหะและลูปพลาสติกสำหรับเขี่ยเชื้อ

2.1.14 ลวดดัดเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาดพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร

2.1.15 Anaerobic jar ขนาด 2.5 ลิตร (AG0025, Oxoid ™England)

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำวิจัย

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate Agar (CCDA) (CM0739, Oxoid ™ England)

2.2.2 supplement (SR0155E, Oxoid ™) ซึ่งประกอบด้วย cefoperazone 16.0 มิลลิกรัม และ Amphotericin B 5.0 มิลลิกรัม

2.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Bolton Selective Enrichment Broth (CM0983, Oxoid ™)

2.2.4 supplement (SR208E, Oxoid ™England) ซึ่งประกอบด้วย cefoperazone 10 มิลลิกรัม trimetroprim 10 มิลลิกรัม vancomycin 10 มิลลิกรัม amphotericine B 10 มิลลิกรัม

2.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller – Hinton broth (CM0405, Oxoid ™England)

2.2.6 สารละลายเจือจาง 0.85% normal saline (diluent)

2.2.7 น้ำกลั่น

2.2.8 oxidase reagent เตรียมโดยใช้ para-aminodimethyanaline oxalate 1 กรัม ผสมกับ distilled water 100 มิลลิลิตรโดยใช้ความร้อนช่วยในการทำละลาย ภายหลังได้สารละลาย oxidase reagent แล้วให้เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2.2.9 Catalase reagent เตรียมโดยใช้ 3% (v/v) ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3. วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินการวิจัยโดยกำหนดพื้นที่ในการศึกษาวิจัยในโรงฆ่าสัตว์ที่ได้รับใบอนุญาตตั้งโรงฆ่าสัตว์ โรงพักสัตว์และการฆ่าสัตว์จากหน่วยงานราชการ อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี แหล่งของการนำเข้าสุกรที่จะเข้าฆ่าที่โรงฆ่าสุกรจะต้องเป็นฟาร์มสุกรที่ได้รับใบรับรองมาตรฐานฟาร์เลี้ยงสุกรจากกรมปศุสัตว์ ผู้วิจัยจึงได้กำหนดการศึกษาครั้งนี้ที่โรงฆ่าและชำแหละสุกรของ บริษัทจีรศักดิ์ฟาร์มอุบลราชธานีจำกัด ซึ่งมีทั้งโรงฆ่าสุกรและฟาร์มสุกร

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

มาตรฐานซึ่งสามารถตรวจสอบแหล่งที่มาของสุกรที่เข้าฆ่าเป็นสุกรที่มาจากฟาร์มมาตรฐานฟาร์มเลี้ยงสุกรที่รับรองโดยกรมปศุสัตว์ ให้มั่นใจว่ากลุ่มสุกรที่เก็บตัวอย่างจะเป็นสุกรที่มาจากระบบการเลี้ยงเดียวกัน ชุดระยะการผลิตเดียวกัน โดยแบ่งเป็นขั้นตอนในการทำการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน ซึ่งมีวิธีการดำเนินงานดังนี้

3.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

3.1.1 การสุ่มตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างจากสุกรที่เข้าโรงฆ่าในกลุ่มประชากรเป้าหมายแบบอย่างง่าย (simple random sampling) แบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต และกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต โดยคำนวณจำนวนตัวอย่างจากสูตร

$$n = \frac{[1.96\,(2pq)^{1/2} + 084\,(p_1q_1 + p_2q_2)]^2}{(p_2 - p_1)^2}$$ (ภาวิน ผดุงทศ, 2550)

โดยกำนดให้ n = จำนวนขนาดตัวอย่างในแต่ละกลุ่มทดลอง ; $p = 1 - q$; $p = (p_1 + p_2)/2$

p_1 = สัดส่วนตัวอย่างที่สัมผัสปัจจัยเสี่ยง ; p_2 = สัดส่วนตัวอย่างที่มีการควบคุมปัจจัยเสี่ยง

โดยกำหนดค่าสัดส่วนตัวอย่างที่มีการสัมผัสปัจจัยเสี่ยง (p_1) = 0.60 (Padungtod and Kaneene, 2005) และสัดส่วนตัวอย่างที่มีการควบคุมปัจจัยเสี่ยง (p_2) = 0.17 (Oosterom et al., 1985) จากการคำนวณได้จำนวนตัวอย่าง กลุ่มละ 15 ตัวอย่าง รวม 30 ตัวอย่าง แต่การทดลองได้ปรับเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการเก็บข้อมูลเพื่อให้มีความแม่นยำมากขึ้น จึงเก็บกลุ่มตัวอย่างละ 24 ตัวอย่าง รวม 48 ตัวอย่าง

3.1.2 การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

โรงฆ่าสุกรที่ดำเนินการศึกษาเป็น 1 โรงฆ่าสุกรโดยกำหนดให้มีการเก็บตัวอย่างครั้งแรกเป็นกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต หลังจากนั้นที่โรงฆ่าสุกรเดิมก่อนการเก็บตัวอย่างครั้งที่สองมีการแนะนำและอธิบายการปฏิบัติที่ดีสำหรับโรงฆ่าสุกร

3.1.2.1 กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต (กลุ่มที่ 1) หมายถึง กลุ่มที่มีการเก็บตัวอย่างจากซากสุกรจากโรงฆ่าที่ไม่ได้มีการควบคุมจุดวิกฤต หรือไม่มีความเข้มงวดเรื่องวิธีปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะ (good hygienic practice) โดยปล่อยให้ดำเนินงานตามปกติ ตามรูปแบบหรือวิธีการที่บุคลากรในโรงฆ่าสุกรเคยปฏิบัติ

3.1.2.2 กลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต (กลุ่มที่ 2) หมายถึง กลุ่มที่มีการเก็บตัวอย่างจากซากสุกรจากโรงฆ่าที่มีการควบคุมจุดวิกฤต หรือมีความเข้มงวดเรื่องวิธีปฏิบัติในโรงฆ่าสุกรที่ถูกสุขลักษณะ โดยดำเนินการให้คำแนะนำในการปฏิบัติตามวิธีการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อโรคตาม

10.14457/KU.the2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

หลัก "การปฏิบัติที่ดีสำหรับโรงฆ่าสัตว์" ของ มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช) 9009-2549 ดังต่อไปนี้

(1) ขั้นตอนการเปิดผ่าซากสุกรให้ใช้ถุงพลาสติกพร้อมหนังยางรัดในส่วนของการหุ้มส่วนปลายของทวารหนักก่อนการเปิดผ่าซาก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อโรคจากทวารหนักมายังซากสุกร

(2) ขั้นตอนการตัดหัว ให้ระมัดระวังในการตัดหัวออกจากซากสุกร โดยการตัดให้ตัดตามแนวกระดูกคอชิ้นที่ 1 เลาะไปยังหลังหูมาจนถึงบริเวณคอ โดยระมัดระวังต่อมน้ำเหลืองหลังใบหู และใช้วิธีการเปลี่ยนมีดเมื่อกรีดตัดหัวสุกรแต่ละตัว

(3) มีดจะต้องมีการเปลี่ยนในการใช้งานและมีการจุ่มน้ำยาฆ่าเชื้อหรือน้ำร้อนอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนข้ามของเชื้อโรคที่มาจากการใช้มีด

(4) ให้คำแนะนำสำหรับพนักงานทุกคน ในการปฏิบัติในระหว่างการฆ่าสุกรเกี่ยวกับสุขอนามัยในโรงฆ่า และขั้นตอนในการระมัดระวังการปนเปื้อนเชื้อจากลำไส้และต่อมน้ำเหลืองที่กักเก็บเชื้อโรคมายังซากสุกร ตลอดจนถึงการปนเปื้อนข้ามของเชื้อโรคจากอุปกรณ์ในการใช้ มีด ภาชนะต่างๆ รวมทั้งมือและสุขอนามัยของผู้ปฏิบัติงาน ดังแสดงในตารางที่ 3

(5) ผู้ปฏิบัติงานจะต้องทำหน้าที่ในตำแหน่งเดิม เหมือนกับการเก็บตัวอย่างในกลุ่มที่ไม่ควบคุมจุดวิกฤตเพื่อป้องกันการลำเอียงในการทดลองทั้งคนพนักงานฆ่าสุกร พนักงานตรวจโรคสัตว์ ผู้เก็บตัวอย่าง (ตารางภาคผนวกที่ 9)

3.1.3 การสุ่มเก็บตัวอย่างในขั้นตอนการฆ่าสุกร

ในการฆ่าสุกรตามปกติจะแบ่งเป็นชุดๆ ละ 10 ตัว แล้วทำความสะอาดระบบสายการผลิตก่อนที่จะเริ่มชุดสุกรที่จะเข้าฆ่าต่อไป ดังนั้นจึงสุ่มตัวอย่างโดยจับฉลากสุ่มจากลำดับสุกรที่เข้าฆ่าในแต่ละชุดฆ่าๆ ละ 6 ตัวอย่าง จำนวน 4 ชุด รวม 24 ตัว โดยเก็บตัวอย่างกลุ่มที่ไม่มีการควบจุดวิกฤตเป็นกลุ่มที่ 1 หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์จึงเก็บตัวอย่างกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตกลุ่มที่ 2 โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตดังแสดงในตารางที่ 3

10.14457/KKU.the2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

ตารางที่ 3 บริเวณและตำแหน่งการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจการปนเปื้อนของแคมไพโลแบคเตอร์ในโรงฆ่าสุกร

จุดวิกฤตในโรงฆ่าสุกร	ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม	
	กลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤต	กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต
1. ตัดหัวสุกร	1. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน 2. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก	1. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน 2. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก
2. เปิดผ่าซาก	1. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก 2. เก็บตัวอย่างบริเวณรอบๆ ลิ้น คอหอย ทอนซิล 3. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน	1. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก 2. เก็บตัวอย่างบริเวณรอบๆ ลิ้น คอหอย ทอนซิล 3. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน
3. ตรวจเนื้อ	1. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก 2. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน	1. เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก 2. เก็บตัวอย่างมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน

3.1.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำตรวจการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์ในซากสุกรในโรงฆ่าสุกร ให้ทำตามวิธีการดังต่อไปนี้ทั้งกลุ่มที่มีการควบคุมและไม่ควบคุมจุดวิกฤต

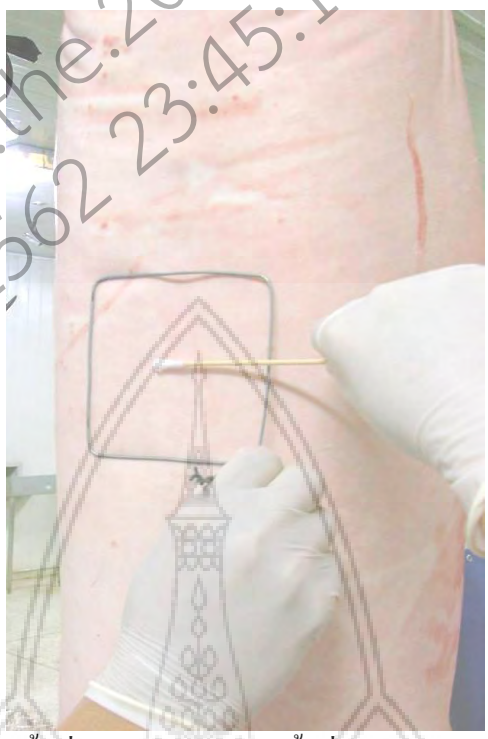
3.1.4.1 วิธีการเก็บตัวอย่างในแต่ละตำแหน่ง

(1) การเก็บตัวอย่างจากซากสุกรในตำแหน่งต่างๆ ทำได้โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อ (swabs) บริเวณพื้นผิวซากสุกรในตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่งแต่ละตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างให้ใช้แม่แบบขนาด 10 x 10 เซนติเมตร (100 ตารางเซนติเมตร) โดยใช้ลวดดัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัสและดัดส่วนปลายลวดให้เป็นด้ามจับ และใช้ลวดนี้กำหนดพื้นที่ในการป้ายเชื้อ โดยใช้ 1 ก้านไม้พันสำลีต่อ 1 ตำแหน่งซาก ดังแสดงวิธีการป้ายเชื้อในภาพที่ 6 ทั้งนี้ยกเว้นการเก็บตัวอย่างที่ตำแหน่งหาง ให้ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อรอบๆ บริเวณหาง

(2) การเก็บตัวอย่างบริเวณรอบๆ ลิ้น คอหอย และทอนซิล ทำได้โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อโดยให้สำลีสัมผัสพื้นที่ทั้งหมดบริเวณลิ้น คอหอย และทอนซิล

(3) การเก็บตัวอย่างจากมีดภายหลังที่ใช้ในการปฏิบัติงาน ทำได้โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อโดยรอบพื้นที่ผิวสัมผัสของใบมีดและด้ามมีดโดยรอบ

10.14457/KKU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13



ภาพที่ 6 ลักษณะการกำหนดพื้นที่และวิธีในการป้ายเชื้อที่ตำแหน่งแนวสันหลังของซากสุกร

3.1.4.2 วิธีการในการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดวิกฤตในโรงฆ่าสุกร

(1) จุดที่มีการตัวหัวสุกร

(1.1) เก็บตัวอย่างจากมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อนำมาป้ายเชื้อจากมีดภายหลังที่ใช้ปฏิบัติงานจำนวน 1 ตัวอย่างต่อซากสุกร ทำการป้ายเชื้อโดยรอบพื้นที่ผิวสัมผัสของใบมีดและด้ามมีดโดยรอบ แล้วเก็บใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง นำมาเก็บไว้ในที่กล่องที่มีน้ำแข็งให้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลองนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว (Donnison, 2003) เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง Mueller – Hinton Broth (MHB) ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(1.2) เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ป้ายไปที่ตำแหน่งซากที่ต้องการเก็บตัวอย่างโดยใช้ 1 ก้านไม้พันสำลีต่อ 1 ตำแหน่งซาก แล้วนำสำลีที่ได้ทั้งห้าตำแหน่งมารวมกัน (pool sample) (พื้นที่รวม 500 ตารางเซนติเมตร) ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ต่อการเก็บ 1 ตัวอย่างต่อซากสุกร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง แล้วนำหลอดทดลองมาเก็บไว้ในที่

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการ โดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) จุดที่มีการเปิดผ่าซาก

(2.1) เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ป้ายไปที่ตำแหน่งซากที่ต้องการเก็บตัวอย่าง โดยใช้ 1 ก้านไม้พันสำลีต่อ 1 ตำแหน่งซาก แล้วนำสำลีที่ได้ทั้งห้าตำแหน่งมารวมกัน (pool sample) (พื้นที่รวม 500 ตารางเซนติเมตร) ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ต่อการเก็บ 1 ตัวอย่างต่อซากสุกร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง แล้วนำหลอดทดลองมาเก็บไว้ในที่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการ โดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2.2) เก็บตัวอย่างบริเวณรอบๆ ลิ้น คอหอย และทอนซิล โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อโดยให้สำลีสัมผัสพื้นที่ทั้งหมดบริเวณลิ้น คอหอย และทอนซิล ในซากสุกรที่ต้องการเก็บตัวอย่าง โดยใช้ 1 ก้านไม้พันสำลีต่อบริเวณดังกล่าวต่อซากสุกร แล้วนำสำลีที่ได้เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง แล้วนำหลอดทดลองมาเก็บไว้ในที่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการ โดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2.3) เก็บตัวอย่างจากมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อนำมาป้ายเชื้อจากมีดที่ใช้ปฏิบัติงานจำนวน 1 ตัวอย่างต่อซากสุกร แล้วเก็บใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง นำมาเก็บไว้ในที่กล่องที่มีน้ำแข็งให้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการ โดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

(3) จุดที่มีการตรวจเนื้อ

(3.1) เก็บตัวอย่างจากซากสุกร 5 ตำแหน่ง คือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก โดยการใช้ไม้พันสำลีป้ายไปที่ตำแหน่งดังกล่าวต่อซากที่ต้องการเก็บตัวอย่างแล้วนำสำลีที่ได้ทั้งห้าตำแหน่งมารวมกัน (pool sample) (พื้นที่รวม 500 ตารางเซนติเมตร) ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง แล้วนำหลอดทดลองมาเก็บไว้ในที่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3.2) เก็บตัวอย่างจากมีดที่ใช้ปฏิบัติงาน โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อนำมาป้ายเชื้อจากมีดที่ใช้ปฏิบัติงานจำนวน 1 ตัวอย่าง แล้วเก็บใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง นำมาเก็บไว้ในที่กล่องที่มีน้ำแข็งให้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้จำนวนตัวอย่าง 1 ตัวอย่างต่อซากสุกร รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ภายหลังการตรวจซากโดยพนักงานตรวจโรคสัตว์ จะมีการล้างซากอีกครั้ง ให้ทำการเก็บตัวอย่างจากซากสุกรที่ล้างเสร็จแล้ว โดยการใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อนำมาป้ายเชื้อที่ตำแหน่งซากสุกรทั้ง 5 ตำแหน่งคือ หัว ขาหลัง หาง แนวสันหลัง ทวารหนัก โดยใช้ไม้พันสำลี 1 ก้านต่อตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง 1 ตำแหน่ง เก็บลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร (1 ตำแหน่งต่อหลอดทอดลอง) จะได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่างต่อซากสุกร แล้วปิดฝาให้สนิท ติดฉลากหมายเลขตัวอย่าง แล้วนำหลอดทดลองมาเก็บไว้ในที่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส รวบรวมตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลอง นำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการให้ย้ายสำลีที่ป้ายเชื้อมายัง MHB ในหลอดทดลอง 20 มิลลิลิตร โดยให้เหลือพื้นที่ว่างในหลอดทดลองให้น้อยที่สุด แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ดังนั้นรวมจำนวนตัวอย่างที่จะต้องเก็บในทุกจุดวิกฤตจะได้จำนวน 12 ตัวอย่างต่อซากสุกร รวมต้องเก็บตัวอย่างทั้งหมดในหนึ่งกลุ่มการทดลอง 288 ตัวอย่าง และรวมจำนวนตัวอย่างทั้งสองกลุ่มการทดลองเท่ากับ 576 ตัวอย่าง

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 22:45:13

3.2 ขั้นตอนในการเพาะเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ (ภาพที่ 7)

3.2.1 การฟื้นกลับคืนและเพิ่มจำนวนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

หลังจากที่ได้ตัวอย่างที่นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว โดยใช้ไปเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูด MHB ที่มีเชื้อมา 1 มิลลิลิตร จากหลอดเก็บตัวอย่างมาผสมกับ Bolton Broth ที่มี supplement (SR208E, Oxoid™) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะบรรยากาศแบบ microaerophillic (5 - 6% ออกซิเจน 10% คาร์บอนไดออกไซด์ 84 - 85% ไนโตรเจน) (BBL™ GasPak™) ใน Anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2 คัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เพื่อการพิสูจน์เชื้อ

นำเชื้อที่ได้จากการทำการฟื้นกลับคืนและเพิ่มจำนวน (enrichment) โดยใช้ลูปปราศจากเชื้อจุ่มลงไปใน Bolton broth ที่มีเชื้อให้ได้ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร ลงไปเกลี่ยเชื้อใน CCDA ที่มี supplement (SR0155E, Oxoid™) แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะบรรยากาศแบบ microaerophillic (5 - 6% ออกซิเจน 10% คาร์บอนไดออกไซด์ 84 - 85% ไนโตรเจน) (BBL™ GasPak™) ใน Anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

10.14457/KKU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเพาะและทดสอบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ดัดแปลงจาก Donnison (2003)

10.14457/KKU the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

3.3 ขั้นตอนในการทดสอบยืนยันพิสูจน์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

3.3.1 การทดสอบโดยกล้องจุลทรรศน์

3.3.1.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCDA

หลังจากบ่มเชื้อประมาณ 2 วัน จะพบโคโลนีของเชื้อมีลักษณะแบน มีสีเทาอ่อน และมีลักษณะใส คล้ายหยดน้ำ กระจายตามรอยเขี่ยเชื้อ ถ้าจานเพาะเชื้อค่อนข้างแห้งโคโลนีจะไม่แผ่ขยายและจะแยกขอบเขตและยกตัวขึ้นเห็นเป็นลักษณะโค้ง กลม ซึ่งมีลักษณะดังภาพที่ 8

ภาพที่ 8 ลักษณะของโคโลนีเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่แยกได้จากซากสุกร

3.3.1.2 ลักษณะเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำลักษณะโคโลนีจำเพาะต่อแคมไพโลแบคเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อใน CCDA ที่มี supplement (SR0155E, Oxoid™) เป็นเวลา 2 วัน มาทดสอบลักษณะเชื้อโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อตรวจดูการเคลื่อนที่ที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อคือการเคลื่อนที่แบบเกลียวสว่าน (cork skrew-like motion) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อป้ายโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายดังคำอธิบายข้างบน นำมาแตะบนแผ่นสไลด์แล้วหยดน้ำกลั่นลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งหากพบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จะเห็นการเคลื่อนที่แบบหมุนเป็นเกลียวสว่าน คล้ายลูกดอก หรือเป็นการเคลื่อนที่แบบไร้ทิศทาง

3.3.2 การทดสอบโดยการย้อมแกรม

การทดสอบเชื้อโดยการย้อมแกรมทำได้โดยนำลูปเขี่ยเชื้อป้ายเชื้อที่มีลักษณะเฉพาะสำหรับแคมไพโลแบคเตอร์ มาแตะลงบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปผ่านความร้อนเพื่อตรึงเซลล์กับแผ่น

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

สไลด์ แล้วหยดสีคริสตัลไวโอแลต ลงบนเชื้อทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสารละลายไอโอดีนลงบนสไลด์ 10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95% จากนั้นหยดสีซาฟรานิน โอ (safranin O) ลงบนเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำแผ่นสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตเซลล์ที่ติดสีแดงของซาฟรานิน โอ จะพบลักษณะรูปร่างเซลแบบแท่ง และบิดเกลียวคล้ายรูปตัวเอส (S) หรือปีกนกนางนวล

3.3.3 การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส

หยดน้ำยาสำหรับใช้ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส ซึ่งเตรียมจาก Para - aminodimethyanaline oxalate 1 กรัม ผสมกับ distilled water 100 มิลลิลิตร หยดน้ำยาลงบนกระดาษกรอง (Whatman No 1, England) จนน้ำยาดูดซึมบนกระดาษ แล้วนำพลาสติกลูปป้ายเชื้อมาเต็มลูป มาขีดลงบนกระดาษกรองที่หยดน้ำยาทดสอบออกซิเดส ยาวประมาณ 3 – 6 มิลลิเมตร ซึ่งหากการทำสอบให้ผลเป็นบวก จะพบรอยขีดมีลักษณะสีม่วงเข้มใน 5 – 10 วินาที

3.3.4 การทดสอบปฏิกิริยาคาตาเลส

หยดน้ำยาสำหรับใช้ทดสอบปฏิกิริยาคาตาเลส ซึ่งเตรียมจาก 3% (v/v) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนแผ่นกระจกสไลด์จำนวนหนึ่งหยด แล้วนำพลาสติกลูปป้ายเชื้อมาเต็มลูปนำมาเขี่ยลงบนหยดน้ำยาที่อยู่บนแผ่นกระจกสไลด์และรอดูปฏิกิริยาการเกิดฟองอากาศที่เกิดขึ้นเมื่อเชื้อที่เขี่ยลงไปสัมผัสกับน้ำยาที่ใช้ทดสอบ (Donnison, 2003) ซึ่งเชื้อในกลุ่มแคมไพโลแบคเตอร์ จะให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแคมไพโลแบคเตอร์

ลักษณะคุณสมบัติทางเคมี	ชนิดของแคมไพโลแบคเตอร์			
	C. jejuni	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+/-	-(or weak)
H2S production (TSI)	-	-/+	-	-
Hippurate hydrolysis	+	-	-	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก Donnison (2003)

10.14457/KU.the.2010.370
เมื่อ 21/02/2562 23:45:13

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลของการพบหรือไม่พบแคมไพโลแบคเตอร์เป็นข้อมูลแบบไม่ต่อเนื่อง (discrete data) ของตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด นำมาวิเคราะห์หาค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงระหว่างกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป EpiInfo เวอร์ชั่น 6.04d ปี ค.ศ. 2004 นำมาทดสอบด้วย Chi – square (2 x 2) หรือ Fisher's Exact ทดสอบนัยสำคัญของความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตและกลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤต โดยนำค่าข้อมูลของการพบหรือไม่พบแคมไพโลแบคเตอร์มาทดสอบในตาราง Chi – square โดยจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อแคมไพโลแบคเตอร์จะลงตัวเลขจำนวนในช่องที่ให้ผลบวกของการเกิดโรค และจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อแคมไพโลแบคเตอร์จะจะลงตัวเลขจำนวนในช่องที่ให้ผลลบของการเกิดโรค และกำหนดให้กลุ่มที่ไม่มีการควบคุมจุดวิกฤตเป็นกลุ่มที่มีการสัมผัสปัจจัยเสี่ยงและกลุ่มที่มีการควบคุมจุดวิกฤตเป็นกลุ่มที่ไม่มีการสัมผัสปัจจัยเสี่ยงในตาราง Chi – square เพื่อบอกได้ว่าปัจจัยเหล่านั้นเป็นสาเหตุให้มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแคมไพโลแบคเตอร์หรือไม่ โดยพิจารณาจากค่าสัมพันธ์ความเสี่ยง (Odd ratio: OR) หากค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่ากลุ่มที่สัมผัสปัจจัยเสี่ยงมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้สัมผัสปัจจัยเสี่ยงนั้นเป็นจำนวนเท่าตามตัวเลขที่มากกว่า 1 ทั้งนี้ค่า 95% confidence interval ของ OR ไม่คร่อมค่า 1 จะถือว่ามีความแตกต่างกัน แต่ถ้าค่าสัมพันธ์ความเสี่ยงมีค่าน้อยกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยเสี่ยงนั้นอาจเป็นปัจจัยสนับสนุนทำให้การเกิดโรคลดน้อยลง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น