บทที่ 2
ระเบียบวิธีวิจัย

ในระหว่างเดือน พฤษภาคม ถึงเดือน มิถุนายน 2553 ออกเก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรจากฟาร์มสุกรในท้องที่จังหวัดเลยโดยวิธี rectal swab จำนวน 25 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างไว้ใน transport media (Cary Blair transport medium, Oxoid) ขณะนำส่งเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการและตรวจภายใน 24 ชั่วโมง

ในระหว่างเดือน กรกฎาคม ถึงเดือน สิงหาคม 2553 ออกเก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรจากโรงฆ่าสุกรในท้องที่จังหวัดขอนแก่นโดยวิธี rectal swab จำนวน 100 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างไว้ใน transport media (Cary Blair transport medium, Oxoid) ขณะนำส่งเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการและตรวจภายใน 24 ชั่วโมง

ในระหว่างเดือน กรกฎาคม ถึงเดือน สิงหาคม 2553 ออกเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากบริเวณโรงฆ่าสุกรในท้องที่จังหวัดขอนแก่น (โรงฆ่าสุกรเดียวกันกับที่เก็บตัวอย่างอุจจาระสุกร) จำนวน 100 ตัวอย่าง

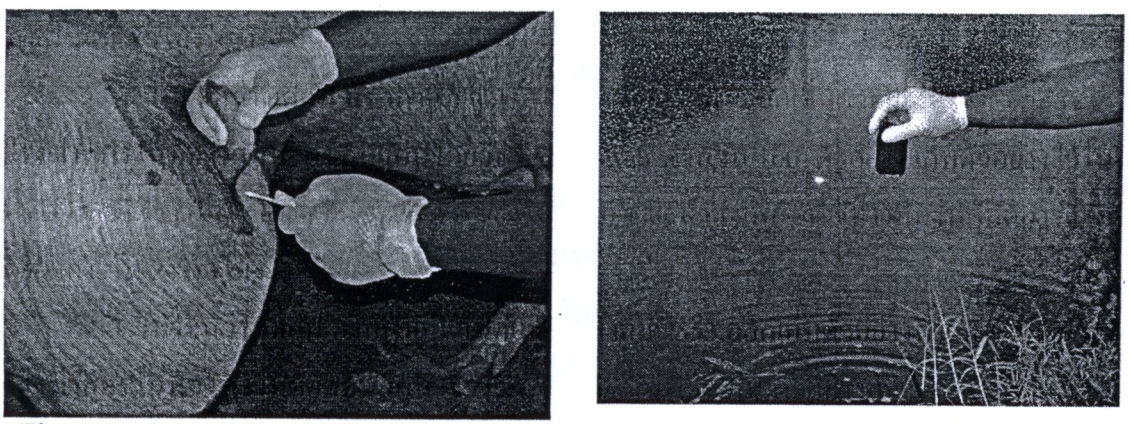

Figure 1. Sampling of pig feces using rectal swab and sewage samples from the pig slaughterhouses

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เพาะแยกเชื้อ *E.coli* โดยใช้ EC Broth, EMB plate เลือกโคโลนีที่แบน จุดตรงกลางสีดำมี metallic sheen มา 2 โคโลนี ลงใน nutrient broth บ่มที่ 37°C ระยะเวลา 24 ชม. นำเชื้อไปย้อมสีแกรมดูรูปร่างของเชื้อ ถ้าพบแบคทีเรียรูปทรงกระบอกสั้นหรือทรงกลมติดสีชมพูจะนำไปทดลองทางชีวเคมีด้วยการทดสอบ IMViC เพื่อยืนยันว่าเป็น *E.coli* และทดสอบการดื้อยา โคโลนีที่ยืนยันว่าเป็น *E.coli* ทำการเก็บเชื้อใน nutrient agar slant บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับด้วย 40% glycerol และเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C

การคัดแยก bacteriophage ที่จำเพาะต่อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ก่อโรค

ใช้เชื้อ *E.coli* ที่แยกได้มาเพื่อแยกหา *E.coli* phages จากอุจาระและน้ำเสียจากฟาร์มสุกร อุจจาระสุกรและน้ำเสียจากโรงฆ่าสุกร โดยใช้ตัวอย่างๆ ละ 15 มล. มาปั่นที่ 3500 x g ระยะเวลา 25 นาที ที่ 10 °C นำน้ำส่วนบนมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 µl-pore-size filter แล้วดูดมา 8.6 มล. เติม 1 มล. 10x LB Broth และ100 µl (10^8 CFU) *E.coli* แล้วนำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 150 rpm แล้วนำไปปั่นแยกเศษของแบคทีเรียที่ 10,000 x g ระยะเวลา 10 นาที แล้วนำน้ำส่วนบนมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 µl-pore-size filter แล้วนำไปวิเคราะห์หาฟาจโดยใช้ 300 µl supernatant ที่กรองได้มาทดสอบหา Single phage plaques แล้วผสมกับ 200 ไมโครลิตร ของ *E.coli* culture ที่บ่มใน broth ไว้แล้ว 1 คืน นำไปบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที แล้วผสมกับ 2.5 มล. Molten top agar (0.6% agar) ที่ 50°C แล้วเทลงบน LB agar plates แล้วนำไปบ่มที่ 37°C นาน 18-24 ชม. แล้วนำมาเก็บ Phage plaques จาก plate ที่มีลักษณะเป็น Single plaques แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ 3 ครั้งกับเชื้อ *E.coli* ตามวิธีของ Xie et al (2005) การนำ *E.coli* phages ที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดหาความเข้มข้นด้วยวิธีไตเตรด ทำ dilution series และนับ Single plaques แล้วคำนวณความเข้มข้นตามวิธีของ Xie et al (2005)

การทดสอบหา Single phage plaques

หา Single phage plaques ที่สามารถทำลาย host ที่เป็น *E.coli* ด้วยวิธี double layer agar นำ *E.coli* phages ขนาดความเข้มข้น 10^{10} PFU ที่ได้จากข้อ 4 มาทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E.coli* ใน LB Broth จากนั้นนำ phage ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์และเก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

การแยก serogroup และ serotype ของเชื้อ *E. coli*

นำเชื้อ *E. coli* ทุก ไอโซเลทที่ยแกได้ มาทดสอบ ด้วยน้ำยาแอนตี้ซีรัมสำหรับตรวจแยก serogroup ของ *E. coli* (O&K) polyvalent 11 โดยส่งตรวจที่ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และทดสอบ serotype O157:H7 ของเชื้อ *E.coli* ด้วยวิธี latex agglutination test (*Escherichia coli* O157 latex test; Oxoid Ltd.)

การศึกษาประสิทธิผลของฟาจต่อการป้องกันและรักษาโรคจากเชื้อ *E .coli* ในลูกสุกร

โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ฟาจที่แยกได้ความเข้มข้น 10^{10} CFU (1 ml/10 kg BW) เพื่อใช้ทดลองในลูกสุกรทดลองที่ติดเชื้อ *E.coli* ขนาด 10^5 CFU (1 ml/10 kg BW)

2. ในลูกสุกรทดลองจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยกลุ่มแรกจะสเปร์เฉพาะเชื้อ *E.coli* กลุ่มที่ 2 จะสเปร์เชื้อ *E.coli* เข้าไปในคอกเลี้ยง 1 ครั้ง และตามด้วยการสเปร์ฟาจวันละครั้ง ติดต่อกัน 3 วันและอาทิตย์ละครั้งจำนวน 3 ครั้ง

3. จะสังเกตอาการของลูกสุกรเป็นระยะเวลา 30 วัน การเก็บตัวอย่างอุจาระลูกสุกรและ เลือดลูกสุกรเพื่อตรวจหาเชื้อ *E.coli* และฟาจในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 และ21 วัน ตามลำดับ

4. การตรวจลักษณะฟาจโดยใช้กล้อง EM

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน *E. coli* ของลูกสุกร 2 กลุ่มด้วยวิธี pair t-test โดยโปรแกรม SAS (SAS, 1997)