บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาความชุกของซัลโมเนลลาในขั้นตอนการผลิตเนื้อโคที่วางจำหน่ายข้างถนนในจังหวัดร้อยเอ็ด โดยมุ่งไปที่จุดเสี่ยงที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ใน 3 ขั้นตอนคือ โรงฆ่าสัตว์ การขนส่งซาก และร้านจำหน่าย ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ต้นทางแหล่งผลิตหรือโรงฆ่าสัตว์ จึงแบ่งประชากรกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเนื้อโคที่ผลิตมาจากโรงฆ่าสัตว์ และ กลุ่มเนื้อโคที่ผลิตมาจากสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราว ซึ่งในแต่ละกลุ่มได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างศึกษาในหน่วยขั้นตอนตัดแต่งซากในโรงฆ่าสัตว์ การขนส่งซาก และร้านจำหน่าย

1.1 กลุ่มโรงฆ่าสัตว์ โดยสุ่มเลือกตัวแทนโรงฆ่าโคในจังหวัดร้อยเอ็ดที่ได้รับใบอนุญาตถูกต้องตามกฎหมาย (ใบ ฆจส.2) ซึ่งเป็นโรงฆ่าขนาดเล็กที่มีขั้นตอนการผลิตแบบผสมผสาน ทั้งแบบยกซากพ้นจากพื้น และชำแหละซากติดพื้นโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 5 โรง เก็บตัวอย่างเนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์ๆ ละ 12 ตัวอย่าง รวม 60 ตัวอย่าง จากรถขนซาก 60 ตัวอย่าง และจากร้านจำหน่ายข้างถนน 60 ตัวอย่าง

1.2 กลุ่มสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราว เป็นสถานที่ฆ่าสัตว์ที่ได้รับการประกาศจากผู้ว่าราชการจังหวัดให้เป็นเขตกันดารเพื่อการฆ่าสัตว์นอกโรงฆ่าสัตว์ โดยสุ่มคัดเลือกตัวแทนกลุ่มนี้จำนวน 5 แห่ง เก็บตัวอย่างเนื้อโคจากสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราวแห่งละ 12 ตัวอย่าง รวม 60 ตัวอย่าง จากรถขนซาก 60 ตัวอย่าง และจากร้านจำหน่ายข้างถนน 60 ตัวอย่าง

2. การเก็บตัวอย่างและวิธีการศึกษา

จำนวนตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บเพื่อตรวจวิเคราะห์กำหนดขนาดจำนวนตัวอย่างจากสูตรคำนวณหาขนาดของตัวอย่าง $n = z^2pq/d^2$ ซึ่งใช้ค่าความชุกของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคภายในประเทศไทยคือ 16.97% (สุปราณี เดิมพันธ์ และคณะ, 2548) แทนค่าในสูตรโดยปรับค่าความชุกให้เป็น 17% ใช้ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% และค่าความคลาดเคลื่อนที่ 10% ได้ผลลัพธ์คือ 54.14 และเพื่อให้เกิดความแม่นยำมากขึ้นจึงเก็บตัวอย่างเพิ่มอีกเป็น 60 ตัวอย่าง สำหรับในร้านจำหน่ายเนื้อโค ใช้ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ความคลาดเคลื่อนที่ 10% ได้ผลลัพธ์ 46.23 ปรับจำนวนเป็น 60 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 360 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

2.1 ตัวอย่างเนื้อโคจากขั้นตอนการตัดแต่งซากในโรงฆ่าสัตว์ และสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราว จำนวน 10 แห่งๆ ละ 12 ตัวอย่างๆ ละ 250 กรัม รวม 120 ตัวอย่าง

2.2 ตัวอย่างป้ายผิวภาชนะบรรจุซากในระหว่างการขนส่ง โดยป้ายผิวภาชนะที่ใช้บรรจุเนื้อโคในการขนส่งซากจากทั้ง 2 กลุ่มๆ ละ 60 ตัวอย่าง รวม 120 ตัวอย่าง

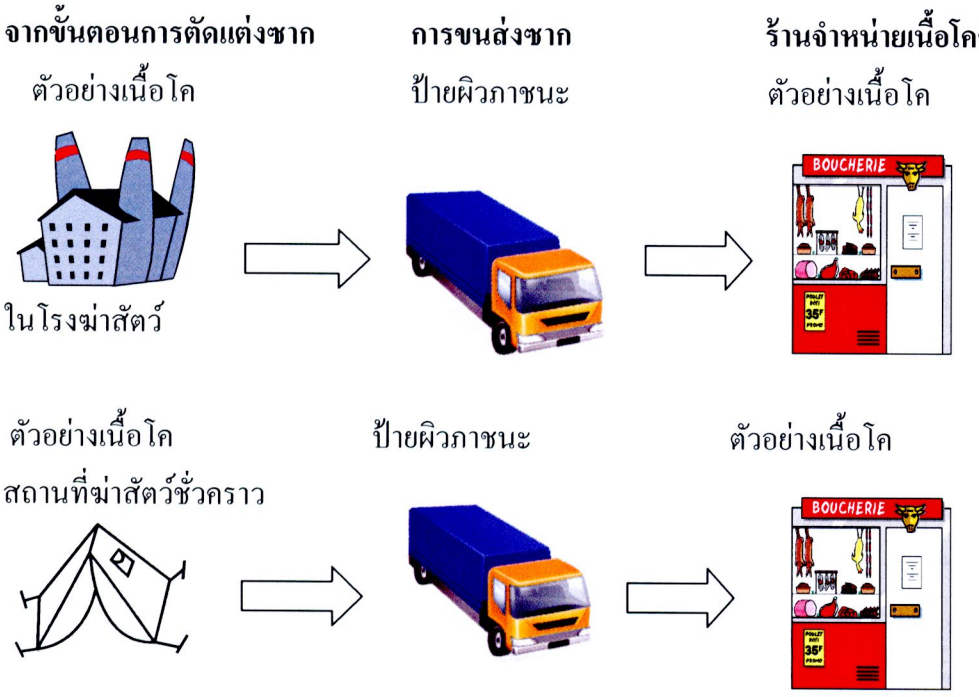
2.3 เก็บตัวอย่างเนื้อโคจากร้านจำหน่ายข้างถนนจำนวน 10 ร้าน ซึ่งแบ่งกลุ่มร้านตามประเภทแหล่งที่มาของเนื้อสัตว์เป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มร้านที่รับเนื้อโคมาจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 5 ร้าน และกลุ่มร้านที่รับเนื้อโคมาจากสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราวจำนวน 5 ร้าน เก็บตัวอย่างร้านละ 12 ตัวอย่างละ 250 กรัม กลุ่มละ 60 ตัวอย่าง รวม 120 ตัวอย่าง

2.4 ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างแบบติดตามซากตั้งแต่ในโรงฆ่าสัตว์ การขนส่ง จนถึงร้านจำหน่าย เป็นตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับซากโคตัวเดียวกัน

2.4.1เก็บตัวอย่างเนื้อโคจากส่วนขาทั้งสี่ขาในขั้นตอนตัดแต่งซาก ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในโรงฆ่าสัตว์ รวมเป็นตัวอย่างละ 250 กรัม

2.4.2 ป้าย (Swab) ผิวภาชนะบรรจุเนื้อโคในขณะขนส่งซากโค ซึ่งเป็นซากโคซากเดิมจากที่เก็บตัวอย่างมาจากโรงฆ่าสัตว์ โดยใช้ก้านสำลีเบอร์ L ที่ผ่านการเชื้อแล้ว นำก้านสำลีที่ป้ายผิวภาชนะบริเวณพื้นก้นและขอบด้านข้าง โดยป้ายในลักษณะทิศทางเดียวไม่ต้องย้อนกลับ จากนั้นนำก้านสำลีเก็บไว้ใน transport media แช่ในกล่องโฟมรักษาความเย็น นำส่งห้องปฏิบัติการ

2.4.3 การเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อโค นำตัวอย่างที่เก็บมาจากโรงฆ่าสัตว์ และร้านจำหน่ายใส่ลงในถุงซิป และบรรจุลงในถุงพลาสติกอีกชั้นปิดมิดชิด แล้วนำไปเก็บในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส แล้วนำส่งตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ภาพที่ 1 แผนผังการเก็บตัวอย่างในการศึกษา

3. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 ถุงพลาสติกชนิดถุงร้อน ขนาด 8 x 12 นิ้ว

3.1.2 ถุงพลาสติกชนิดถุงซิปรูดปาก ขนาด 5 x 8 นิ้ว

3.1.3 กล่องโฟมสำหรับเก็บรักษาตัวอย่าง

3.1.4 ก้านสำลีพันไม้สำหรับสว็อบเก็บตัวอย่าง

3.1.5 ขวดพลาสติกสำหรับเก็บก้านสวอบใส่ transport media

3.1.6 ถุงมือยาง

3.1.7 ขวดสเปรย์แอลกอฮอล์

3.1.8 เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher)

3.1.9 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.1.10 ตู้บ่มเชื้อ

3.1.11 ตู้เย็น

3.1.12 เครื่องผสมตัวอย่าง

3.1.13 แท่งแม่เหล็ก

3.1.14 เครื่องหมุนระหว่างการบ่ม

3.1.15 Freeze-dryer (Lyophilizer) ใช้แทนน้ำแข็งกับการเก็บตัวอย่าง

3.1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.1.17 อ่างน้ำร้อน

3.1.18 ไมโครปิเปต

3.1.19 หลอดบรรจุเชื้อขนาดเล็กเพื่อส่งตรวจแยกซีโรวาร์

3.1.20 ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.21 จานเพาะเชื้อ

3.1.22 หลอดทดลอง

3.1.23 บีกเกอร์ ขนาด 250 ซีซี

3.1.24 หลอดทดลองขนาด 17 x 160 มิลลิลิตร

3.1.25 หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซัลโมเนลลา

3.2.1 Transport media

3.2.2 Buffer Peptone Water (BPW) 0.1% (Oxoid, England)

3.2.3 Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV; Difgo, USA)

3.2.4 Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD; Difgo, USA)

3.2.5 Hektoen enteric agar (HE; Difgo, USA)

3.2.6 Triple sugar iron agar (TSI; Difgo, USA)

3.2.7 Motility indole-lysine agar (MIL; Difgo, USA)

3.2.8 Trypticase soy agar (TSA; Difgo, USA)

3.2.9 Tryptic soy broth agar (TSB; Difgo, USA)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ร้อยละของการพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคในขั้นตอนตัดแต่งซาก

4.2 ร้อยละของการพบเชื้อซัลโมเนลลาในช่วงการขนส่งซากจากโรงฆ่าสัตว์และสถานที่ฆ่าสัตว์ชั่วคราวไปยังร้านจำหน่ายข้างถนน

4.3 ร้อยละของการพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคจากร้านจำหน่ายข้างถนน

4.4 เปรียบเทียบความชุกของเชื้อซัลโมเนลลาจากตัวอย่างระหว่างโรงฆ่าสัตว์ทั้ง 2 ประเภท ระหว่างร้านค้าและ ระหว่างการบรรจุจากโรงฆ่าสัตว์ทั้ง 2 ประเภท ด้วยวิธี Chi-Square โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 17 for Windows

5. ขั้นตอนวิธีการตรวจแยกเชื้อซัลโมเนลลา

ใช้วิธีมาตรฐานตาม ISO 6597:2002 และ Modified method ที่ประยุกต์จากอรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ, 2547 ตามขั้นตอน (ภาพที่ 1) ดังนี้

5.1 ขั้นตอน pre-enrichment

5.1.1 ตัวอย่างที่เป็นไม้พันสำลี (Cotton swab) ป้ายภาชนะบรรจุซากโคในช่วงการขนส่ง โดยทำการป้ายที่บริเวณด้านในก้นภาชนะทั้ง 4 ด้าน โดยการลากก้านสำลีไปในทิศทางเดียวทุกๆ ครั้งแล้วเก็บรักษาไว้ใน transport media ใส่ลงใน BPW ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

5.1.2 กรณีตัวอย่างที่เป็นเนื้อโค หั่นเนื้อโคเป็นชิ้นเล็กๆ 25 กรัม ใส่ใน pre-enrichment medium คือ BPW 225 มิลลิลิตร นำเนื้อใส่ลงถุงพลาสติกอย่างหนา แล้วใช้เครื่องตีชิ้นเนื้อเพื่อทำให้ชิ้นเนื้อตัวอย่างกระจายเป็นชิ้นเล็กๆ หรือละเอียดใน BPW แล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

5.2 ขั้นตอน selective enrichment ถ่ายสารละลายจาก BPW ในข้อ 1 มาแตะบน MSRV ที่บริเวณขอบจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จุดๆ ละ 1 ลูป แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

5.3 ขั้นตอน selective plating เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกคือ มีสีขาวขุ่น จากข้อ 2 มาเพาะเชื้อลงต่อใน XLD และ HE แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

5.4 ขั้นตอน biochemical screening test เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกใน XLD และ HE มีสีแดงตรงกลางมีสีดำ และสีเขียวใส ตามลำดับ จำนวน 3 โคโลนี มาแยกเพาะเชื้อใน TSI และMIL โคโลนีที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองคือ alkaline slant, acid butt, H2S+/-, Gas+/- และ M+/I-/L+ จัดว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลา

6. การแยกกรุ๊ป และซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลา

การแยกซีโรกรุ๊ป โดยการทดสอบผลทางซีรัมวิทยา นำหลอดที่ให้ผลบวกจากขั้นตอน biochemical screening test บนผิวหน้าอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) มาทดสอบการตกตะกอนกับ antiserum A-67, A-I และ A, B, C, D, E, G, H, I ตามลำดับ ส่วนการแยกซีโรวาร์ นำเชื้อซัลโมเนลลาที่ทราบกรุ๊ปใส่ลงบนผิวเอียงของหลอดอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้วส่งหลอดอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) ไปตรวจซ้ำเพื่อแยกกรุ๊ปอีกครั้ง และจำแนกซีโรวาร์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี