บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างเนื้อโคและเลือดสด จากกระบวนการฆ่าชำแหละในโรงฆ่าสัตว์ในเขตพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร จำนวน 2 แห่ง ได้แก่ สหกรณ์โคขุนโพนยางคำ และโรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครสกลนคร และจากสถานที่จำหน่ายเนื้อโคในเขตพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร จำนวน 3 ร้าน ได้แก่ ตลาดสดเทศบาลนครสกลนคร ร้านขายเนื้อข้างทาง และร้านจำหน่ายผลิตภัณฑ์ของสหกรณ์โคขุนโพนยางคำ

3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำวิจัย ได้แก่

3.1.2.1 ชุดย้อมสีแกรม (Crystal violet, สารละลายไอโอดีน, decolorizing agent และ Saffrannin O)

3.1.2.2 อาหาร Plate count agar (PCA)

3.1.2.3 อาหาร Lauryl Tryptose Broth (LTB)

3.1.2.4 อาหาร EC medium

3.1.2.5 อาหาร Eosin Methylene Blue (EMB) agar

3.1.2.6 อาหาร Brilliant Green Lactose Bile (BGLB)

3.1.2.7 อาหาร Mannitol salt egg yolk (MSEY) agar

3.1.2.8 อาหาร Baird-Parker (BP) agar

3.1.2.9 อาหาร Muller Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKT) broth

3.1.2.10 อาหาร Trypticase soy broth (TSB)

3.1.2.11 อาหาร Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar

3.1.2.12 อาหาร Salmonella shigella (SS) agar

3.1.2.13 Absolute ethanol (BDH Prolabo, UK)

3.1.2.14 Sodium chloride (NaCl)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทำวิจัย ได้แก่

3.1.3.1 Autopipette ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Vivantis)

3.1.3.2 Parafilm M (Whatman)

3.1.3.3 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope: Nikon Eclipse E400)

3.1.3.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance: Mettler Toledo AG204)

3.1.3.5 เครื่องผสม (Vortex: KMs1 Minishaker)

3.1.3.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: Memmert BE400)

3.1.3.7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator: Labbc NSW2204)

3.1.3.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave: Hirayama Hiclave HVE-50)

3.1.3.9 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow: Telstar AV-100)

3.1.3.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter: Orion 2 star pH benchtop)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อโคและเลือดโคสด

3.2.1.1 ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อโคจากกระบวนการฆ่าชำแหละ (โรงฆ่าสัตว์) จำนวน 2 แห่งคือ โรงฆ่าโพนยางคำ และโรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครสกลนคร จังหวัดสกลนคร และติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคจากสถานที่จำหน่ายเนื้อโค จำนวน 3 แห่งคือ ร้านจำหน่ายผลิตภัณฑ์ของสหกรณ์โคขุนโพนยางคำ (เขียงเนื้อ 1), ตลาดสดเทศบาลนครสกลนคร (เขียงเนื้อ 2) และร้านขายเนื้อข้างทาง (เขียงเนื้อ 3)

สำหรับน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อโคที่ทำการเก็บคือ ตัวอย่างละ 250 กรัม โดยบรรจุในถุงพลาสติกที่ติดฉลากเพื่อระบุชื่อตัวอย่าง และวันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็น หรือเก็บในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

3.2.1.2 ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดโคสดจากกระบวนการฆ่าชำแหละ (โรงฆ่าสัตว์) จำนวน 1 แห่งคือ โรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครสกลนคร จังหวัดสกลนคร และติดตามการปนเปื้อนของ

แบคทีเรียก่อโรคจากสถานที่จำหน่าย จำนวน 2 แห่งคือ ตลาดสดเทศบาลนครสกลนคร (เขียงเนื้อ 2) และร้านขายเนื้อข้างทาง (เขียงเนื้อ 3)

สำหรับน้ำหนักของตัวอย่างเลือดโคสดที่ทำการเก็บคือ ตัวอย่างละ 250 กรัม โดยบรรจุในถุงพลาสติกที่ติดฉลากเพื่อระบุชื่อตัวอย่าง และวันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็น หรือเก็บในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

*หมายเหตุ เนื่องจากทางโรงฆ่าโพนยางคำไม่มีการนำเลือดโคไปใช้เพื่อการบริโภค ดังนั้นจึงไม่มีการเก็บตัวอย่างเลือดโคจากแหล่งดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์

3.2.1.3 ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อโคและเลือดโคสด (ตามข้อ 3.2.1.1 และ3.2.1.2) ทั้งหมด 3 ช่วงฤดูกาลคือ 1) ฤดูหนาว (เดือนมกราคม 2555), 2) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน 2555) และ 3) ฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม 2555) เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดต่อไป

3.2.2 ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด ในกระบวนการฆ่าชำแหละและสถานที่จำหน่ายเนื้อโคในเขตพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร ดังนี้

3.2.2.1 ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable plate count) ตามวิธีของ BAM (2001) Chapter 3

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อโค (หรือเลือดโคสด) 25 กรัม มาเจือจางใน 0.85% NaCl (normal saline) ที่ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10 เท่า) เขย่าเพื่อทำให้ตัวอย่างสัมผัสน้ำให้มากที่สุด

2) ทำการเจือจางเชื้อด้วยเทคนิค serial dilution โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน normal saline ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม

3) ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากทุกระดับความเจือจางลงบนเพลทปลอดเชื้อที่ label แล้ว แล้วจึงเททับด้วยอาหาร PCA ที่หลอมเหลว (โดยมีอุณหภูมิประมาณ 60°C) เพื่อทำการ pour plate (ทำ 3 ซ้ำในแต่ละระดับความเจือจาง)

4) นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมด พร้อมบันทึกผล

3.2.2.2 ตรวจวิเคราะห์ MPN *Escherichia coli* ตามวิธีของ BAM (2002) Chapter 4

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อโค (หรือเลือดโคสด) 25 กรัม มาเจือจางใน 0.85% NaCl (normal saline) ที่ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10 เท่า) เขย่าเพื่อทำให้ตัวอย่างสัมผัสน้ำให้มากที่สุด

2) ทำการเจือจางเชื้อด้วยเทคนิค serial dilution โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน normal saline ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางที่ 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นทำการวิเคราะห์แบบ 3-tube MPN โดยใช้ series 3:3:3 ซึ่งประกอบด้วย 5 ขั้นตอนคือ

2.1) MPN - Presumptive test

- ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ในแต่ละระดับความเจือจางของ 3 tube MPN อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LTB ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่ ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด (ให้สังเกตด้วยว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊ส) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 °C เริ่มคัดหลอดที่เกิดแก๊สที่เวลา 24±2 ชั่วโมง สำหรับหลอดที่ไม่เกิดแก๊สให้บ่มต่อไปอีกให้ครบเวลา 48 ±2 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊ส

2.2) MPN - Confirmed test

- ถ่ายเชื้อจากหลอด LTB ที่เกิดแก๊สลงใน BGLB broth หลอดละ 1 loop นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1°C เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊สนำไปหาค่า MPN จากตาราง MPN ในภาคผนวก ก มีหน่วยเป็น MPN/กรัมตัวอย่าง

2.3) MPN – Confirmed test for fecal coliforms and *E. coli*

- ถ่ายเชื้อจากหลอด LTB ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊สลงใน EC broth ที่มีหลอดดักแก๊สคว่ำอยู่หลอดละ 1 loop โดยถ่ายเชื้อหลอดต่อหลอด นำ EC broth ไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 45.5±0.2 °C เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง เริ่มคัดหลอดที่เกิดแก๊สที่เวลา 24±2 ชั่วโมง ถ้าให้ผล negative (ไม่เกิดแก๊ส) ให้บ่มต่อไปอีกจนครบเวลา 48 ±2 ชั่วโมง คัดเลือกหลอด EC

broth ที่เกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส แล้วนำไปหาค่า MPN จากตาราง MPN ในภาคผนวก ก ค่าที่อ่านได้เป็นค่าของ Fecal coliforms มีหน่วยเป็น MPN/กรัมตัวอย่าง

2.4) MPN - Completed test for *E. coli*

- ใช้ loop ถ่ายเชื้อจาก EC broth ที่เกิดแก๊สมา Streak บนผิวหน้าอาหาร EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีของ *E. coli* บน EMB agar จะมีลักษณะสีม่วงหรือดำ ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ อาจมีหรือไม่มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ (Metallic sheen)

2.5) การรายงานผล

- นับจำนวนหลอดที่พบ *E. coli* ของแต่ละความเจือจาง แล้วนำไปหาค่า MPN จากตาราง MPN ในภาคผนวก ก: ตารางที่ ก1 รายงานผลเป็น MPN/กรัมตัวอย่าง

3.2.2.3 ตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* ดัดแปลงตามวิธีของ BAM (2001) Chapter 12

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อโค (หรือเลือดโคสด) 25 กรัม มาเจือจางใน 0.85% NaCl (normal saline) ที่ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10 เท่า) เขย่าเพื่อทำให้ตัวอย่างสัมผัสน้ำให้มากที่สุด

2) ทำการเจือจางเชื้อด้วยเทคนิค serial dilution โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน normal saline ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}

3) ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแบบ 3-tube MPN โดยใช้ series 3:3:3

3.1) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ในแต่ละระดับความเจือจางของ 3 tube MPN อย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 8%NaCl ความเจือจางละ 3 หลอด รวม 9 หลอด (ให้สังเกตด้วยว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊ส) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 °C นาน 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น

3.2) ขีดเชื้อ (streak) จากหลอดที่มีการเจริญลงบนอาหาร MSEY agar และ BP agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 °C นาน 48 ชั่วโมง โดยโคโลนีของ *S. aureus* ที่เจริญบน MSEY agar จะมีโซนสีเหลืองอยู่รอบๆ ส่วนอาหาร BP agar จะมีสีดำเป็นมันและมีตะกอนขุ่น

ขาวรอบๆ เลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทำการย้อมสีแกรม สังเกตรูปร่างของ *S. aureus* ซึ่งมีรูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น และติดสีแกรมบวก

3.3) นับจำนวนหลอดของแต่ละระดับความเจือจางที่โคโลนีมีลักษณะดังกล่าวมาหาค่า MPN จากตาราง MPN ในภาคผนวก ก โดยมีหน่วยเป็น MPN/กรัมตัวอย่าง และบันทึกผล

3.2.2.4 ตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ดัดแปลงตามวิธีวิเคราะห์ ISO 6579: 2002 ร่วมกับวีรานุช หลาง (2552) ดังนี้

1) ชั่งตัวอย่างเนื้อโค (หรือเลือดโคสด) 25 กรัม มาเจือจางใน TSB (pre-enrichment broth) ที่ปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร (เพื่อให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10 เท่า) เขย่าเพื่อทำให้ตัวอย่างสัมผัสน้ำให้มากที่สุด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 °C นาน 18-20 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น

2) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ผสมในหลอดอาหาร MKT broth (selective enrichment broth) 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 °C นาน 24±3 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น

3) ใช้ลูปแตะอาหารที่เพาะเชื้อในข้อ 2) นำมา streak ลงใน selective differential agar คือ XLD agar และ SS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 °C นาน 24±3 ชั่วโมง

4) สังเกต single colony ที่เป็นลักษณะเฉพาะของ Salmonella ในอาหารแต่ละชนิด ลักษณะโคโลนีบนอาหาร XLD agar นั้นโคโลนีจะมีสีแดงใส อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง ในขณะที่ SS agar โคโลนีอาจใส หรือทึบไม่มีสี อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง จุดสีดำมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับขนาดของโคโลนี