

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

วิธีการวิเคราะห์หาเชื้อแต่ละชนิด

การตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในอาหาร

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเชื้อ

- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เครื่องตีปั่น stomacher
- ขวดน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 225 และ 9 มิลลิลิตร
- หลอด TSB ที่มีเกลือ 10% ในปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อหลอด
- จานเพาะเชื้อที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker medium (BP) ที่มีส่วนผสมของไข่แดงปราศจากเชื้อ หรือ Mannitol salt agar (MS) ที่มีส่วนผสมของไข่แดงปราศจากเชื้อ ชนิดใดชนิดหนึ่ง
- ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 5 และ 1 มิลลิลิตร
- แท่งแก้วรูปตัว L
- ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35-37°C

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ

ประกอบด้วย

1. อาหารเหลว Trypticase soy
2. อาหารแข็ง Baird-Parke
3. อาหารเหลว Brain heart infusion
4. พลาสมากระต่าย (Rabbit plasma) สำหรับการทดสอบเอนไซม์ coagulase (coagulase test)
5. Peptone water

วิธีการ ประกอบด้วย

1. การเตรียมตัวอย่าง
นำตัวอย่างอาหารมา 25 กรัม ใส่ลงในภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นจึงเติม Peptone water ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อต่อไป

2. ขั้นตอน Pre-enrichment

นำตัวอย่างอาหารจากข้อ 1 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว trypticase soy (ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไป บ่มอุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเติม trypticase soy broth (ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 20) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มอุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ขั้นตอน Selective

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจาย(spread) บนอาหารแข็ง Baird Parker (ทำ 2 ซ้ำ) หรือ นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2 มาลาก (streak) บนอาหารแข็ง Baird Parker เช่น กัน นำไปบ่มอุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง : ผลบวก เมื่อ โคโลนีของ *S. aureus* จะมีสีดำ

4. ขั้นตอนการยืนยันผล(confirmation)

4.1 นำโคโลนีที่คาดว่าจะเป็ *S. aureus* จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว brain heart infusion อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 นำเชื้อจากข้อ 4.1 มาใส่ ลงใน rabbit plasma สังเกตการณ์แข็งตัว(clot) ของพลาสมาที่เกิดขึ้น เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง โดยสังเกตทุกชั่วโมง บันทึกผลของเอนไซม์ Coagulase เมื่อสังเกตเห็นการเกิดการแข็งตัวเป็น 3+ หรือ 4+ เท่านั้น แต่ถ้าเป็น 1+ หรือ 2+ จะต้องทำซ้ำ

ผลการทดลอง : ผลบวก เมื่อ Coagulase test ให้ผล 3+ หรือ 4+

อย่างไรก็ตามควรที่จะทำการทดสอบต่อไปนี้เพื่อช่วยยืนยันเพิ่มเติม เช่น

ก. ย้อมสีแกรม

ผลการทดลอง : ผลบวกเมื่อเซลล์ติดสีแกรมบวก เซลล์รูปร่างกลมเกาะกันเป็นรูปพวงองุ่น

ข. การย่อยสลายเจลาติน (gelatin)

ผลการทดลอง : ผลบวกเมื่อเจลาตินไม่แข็งตัวเมื่ออยู่ในที่อุณหภูมิต่ำ เพราะ *S. aureus* สร้างเอนไซม์ gelatinase ย่อย สลายเจลาติน

ค. การใช้น้ำตาล mannitol

ผลการทดลอง : ผลบวกเมื่อเกิดการด สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของ indicator

ง. การย่อยสลายเม็ดเลือด (haemolysis) บน blood agar

ผลการทดลอง : ผลบวกเมื่อเกิด beta-haemolytic

การตรวจนับปริมาณราและยีสต์ในอาหาร

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการตรวจนับปริมาณราและยีสต์จากตัวอย่างอาหาร

อุปกรณ์

- จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- ปิเปต 1 มิลลิลิตร
- PDA 120 มิลลิลิตร 2 ขวด
- กรดแลคติก หรือ ทาร์ตาริกเข้มข้น 10%
- น้ำยาสำหรับเจือจางตัวอย่างอาหาร 225 มิลลิลิตร 2 ขวด และ 9 มิลลิลิตร 6 ขวด
- แลคโตฟีนอล

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อแล้วเติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วย stomasher นาน 1 นาที
2. เจือจางระดับ 10^{-2} , 10^{-3} , และ 10^{-4}
3. ปิเปตแต่ละระดับความเจือจาง จากข้อ 2 ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ แต่ละระดับทำ 2 ซ้ำ
4. ทำการ acidified PDA โดยเติมกรดแลคติก หรือ ทาร์ตาริก เข้มข้น 10% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงใน PDA 100 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แกว่งเบาๆ ให้เข้ากัน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ
4. เท acidified PDA ลงในอาหารข้อ 3 หมุนจานอาหารเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างอาหารและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแข็ง
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-5 วัน
6. ตรวจนับจำนวนยีสต์และราที่เจริญในจานเลี้ยงเชื้อในช่วง 30-300 โคโลนี แล้ว คำนวณต่อกรัมอาหาร
7. เชียเชื้อยีสต์และราที่แยกได้บนสไลด์ แล้วหยดด้วยแลคโตฟีนอล ปิดทับด้วย cover slip ส่งดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะของเชื้อที่ตรวจพบ

การตรวจวิเคราะห์หา Faecal coliform, Coliform และ *E. coli* โดยวิธี MPN (Most Probable Number)

วิธีการตรวจวิเคราะห์ในอาหาร

ใช้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางระดับละ 10 เท่า ต่อเนื่องกัน 3 ระดับ ทำการเพาะเชื้อในแต่ละระดับโดยใช้ตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตรเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดอาหารระดับความเจือจางละ 3, 5 หรือ 10 หลอด นำหลอดที่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยาที่เราต้องการทดสอบในแต่ละระดับความเจือจางไปอ่านค่าในตาราง MPN

วัสดุอุปกรณ์ ประกอบด้วย

1. จานอาหาร
2. หลอดทดสอบ พร้อมกับหลอดเก็บแก๊ส (Durham tube)
3. ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. ตู้บ่ม

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ ประกอบด้วย

1. อาหาร Pre-enrichment เช่น อาหารเหลว Trypticase Soy
2. อาหารเหลว Lauryl sulphate tryptose broth (LSTB) พร้อมหลอดดักแก๊ส 9 หลอด
3. อาหารเหลว 2% Brilliant Green Lactose Bile (BGLB broth)
4. อาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB agar)
5. สีซ้อมแกรม
6. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ IMVIC (indole, Methyl Red, Vogue Prokkeur และการใช้ citrate)

วิธีการ

ประกอบด้วย

1. ขั้นตอนการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ

เซลล์ที่บาดเจ็บแบบถาวร ไม่สามารถซ่อมแซมให้คืนสภาพเดิม ได้ เซลล์แบบนี้สามารถเจริญบนอาหาร Selective ได้ ถ้านำไปเลี้ยงในอาหาร non-selective หรือ อาหาร Pre-enrichment ก่อน การกระทำเช่นนี้ เรียกว่า “resuscitation” สำหรับเวลาที่ใช้รวมทั้งสถานะในการ resuscitation นั้นจะแตกต่างกันออกไป

นำตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว trypticse soy (อาหาร pre-enrichment) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลานาน 1-2 ชั่วโมง จึงนำไปใช้ในการตรวจหาต่อไป

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี (Most Probable Number) (MPN)

การวิเคราะห์หา MPN ของจุลินทรีย์อาหารสามารถทำได้โดยการนำตัวอย่างอาหารที่ทราบปริมาณ ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จำนวนจุลินทรีย์ต่อหน่วยของตัวอย่างอาหารสามารถคำนวณได้จาก จำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์ที่ต้องการทราบจำนวนเจริญในหลอดนั้น และโดยใช้วิธีทางสถิติช่วยเปลี่ยนเลขจำนวนเจริญในหลอดนั้น และโดยใช้วิธีทางสถิติช่วยเปลี่ยนเลขจำนวนของหลอดที่เชื้อเจริญเป็นตัวเลขแสดงจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารนั้น

ในทางปฏิบัติ ทำโดยใช้ 3- ten-fold serial dilution ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Lauryl sulfate tryptose(LST) แต่ละระดับความเจือจางจะทำ 5 ซ้ำ โดยที่ระดับความเจือจางและปริมาตรที่ใช้ในการถ่ายเชื้อ (inoculation) จะขึ้นอยู่กับปริมาณของจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะมี เช่นถ้าคาดว่าจะมีปริมาณ จุลินทรีย์ต่ำ จะใช้หัวเชื้อ (inoculum) ซึ่งเป็นตัวอย่างอาหารจากข้อ 1 ในปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร และใช้ 10 มิลลิลิตร ของ ten-fold dilution เพื่อใส่ลงในอาหารเหลว LST 10 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า และ 1 มิลลิลิตร ของ ten-fold dilution ใส่ ลงในอาหารเหลว LST 10 มิลลิลิตร การทำเช่นนี้จะได้ค่า sensitivity ตามทฤษฎีเท่ากับ 0.2 และ ถ้าชุดแรกของตัวอย่างอาหาร ที่เป็น 1 มิลลิลิตร ของ homogenate ร้อยละ 10 ค่า sensitivity จะมีค่าเท่ากับ 2

ข้อดีของการทำ MPN คือสามารถใช้กับขนาดของตัวอย่างได้หลายขนาด และมีความไว (sensitive) สูงว่าการทำ Plate count มาก เพราะสามารถใช้ตัวอย่างของเหลวในปริมาณมาก โดยที่ไม่ทำให้อาหาร selective นั้นเสียคุณสมบัติไป

อาหารเหลว LST ที่ใส่ตัวอย่างอาหารลงไปแล้ว ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง : ผลบวก เมื่อมีการเจริญของ coliform หรือ *E. coli* จะสังเกตเห็นฟองอากาศ เกิดขึ้นในหลอด เนื่องจาก coliform หรือ *E. coli* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้แก๊ส การตรวจ แก๊สควรทำในช่วงการบ่มระหว่าง 24-48 ชั่วโมง แก๊สที่เกิดขึ้นสังเกตได้จาก การเกิดฟองอากาศที่ถูกกักอยู่ในหลอดเก็บแก๊ส (Durham tube) ก่อนการทำการสังเกตควรจะเขย่าหลอดเพื่อให้แก๊สที่ถูกกักอยู่ที่ก้นหลอดลอยตัวขึ้น สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมไว้แล้วทำการแช่ในตู้เย็นก่อนการ บ่ม หลังการบ่มแล้วอาจเกิดฟองอากาศเล็กน้อยได้โดยที่ไม่มีการใช้น้ำตาลแลคโตสได้

3. การถ่ายเชื้อลงในอาหาร selective

หลอดของอาหารเหลว LST ที่มีแก๊สเกิดขึ้น คาดว่าในหลอดนั้นจะมีเชื้อ *E. coli* เจริญอยู่ ให้นำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวที่มีแก๊สเกิดขึ้นมาลากลบนอาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB agar) ถ้าต้องการทำการหาจำนวน *E. coli* ที่มีอยู่ในอาหารตัวอย่างจากหลอดของอาหารเหลว LST ที่มีแก๊ส ให้นำไปเพาะต่อในอาหารเหลว Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) และนำมาบ่มที่ 44-44.5°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่ามีการใช้น้ำตาลแลคโตส ถือว่าหลอดนั้นคาดว่ามี *E. coli* เจริญ

เชื้อที่เจริญในขั้นนี้ถือว่าเป็น Faecal coliform จะทำการยืนยันว่าเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว BGLB เป็น *E. coli* โดยการนำมาลากลบนอาหารแข็ง EMB แล้วสังเกตลักษณะโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *E. coli* หลังจากที่ได้บ่มที่อุณหภูมิ 44-45.5°C

ผลการทดลอง : แบคทีเรียที่หมักน้ำตาลแลคโตสไม่ได้ (non-lactose fermenting bacteria) :
โคโลนีใส ไม่มีสี

Coliform : โคโลนีสีดำ หรือสีดำอยู่ตรงกลาง และของใส ไม่มีสี

E. coli : โคโลนีสีเงินดำและมีวาล์วโลหะออกสีเขียวเมื่อมีสีสะท้อนแสง

4. การทดสอบยืนยัน (confirmation)

การทดสอบการยืนยันอาจจะต้องทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร LST เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็น non-spore-forming bacilli สามารถระบุว่าเชื้อนี้เป็น coliform แต่ต้องการทราบให้แน่ชัดว่าเชื้อนี้คือ *E. coli* หรือไม่จะต้องทำการทดสอบต่อทั้ง IMVIC (indole, Methyl Red, Vogue Prokkeur) และการใช้ citrate

Indole เป็นสารที่ได้จากการย่อย tryptophane ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ตรวจ Indole จะต้องมีเปปโตเน ซึ่งมีส่วนประกอบของ tryptophane อย่างพอเพียง สารเคมีที่ใช้ตรวจ Indole คือ KOVAC

Methyl Red เป็นการตรวจการใช้น้ำตาลกลูโคส และผลิตรวมมากพอที่จะเปลี่ยนสีของ methyl red ที่ pH 4.2 และยังคง pH อยู่ตลอดระยะเวลาการบ่ม 5 วัน การตรวจควรจะต้องทำเมื่อครบ 5 วัน เพราะเชื้อบางชนิดสามารถผลิตรวมในระยะแรกของการบ่ม แล้วจะใช้กรดที่ผลิตออกมาทำให้ pH ต่ำลง

ปฏิกิริยา Voges-Proskauer เป็นการตรวจ acetylmethyl carbinol หรือ 2,3 – butanediol ที่ได้จากการที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคส การตรวจสอบทั้งสองชนิดนี้จะแสดงถึงการใช้คาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae จะแสดงผลอันใดอันหนึ่งในสองปฏิกิริยา

TSI agar slant				IMVic			
-----				-----			
Butt	Slant	Gas	H ₂ S	Indole	MR	VP	Citrate
A	A(K)	+	-	+	+	-	-
				หรือ	-	+	-

ที่มา Diliello, L.R., 1982.

การทดลองสำหรับตัวอย่างน้ำ

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำลงใน LB หรือ LSTB ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 5 หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร พร้อมทั้งปิเปต ตัวอย่างน้ำลงใน LB หรือ LSTB ความเข้มข้น 1 เท่า จำนวน 2 หลอดๆ ละ 1 และ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองตัวอย่างอาหารในข้อ 1-3 ทำการอ่านเทียบค่า MPN Faecal coliform, Coliform และ *E. coli* ต่อตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร

รายงานผลการวิเคราะห์

$$\text{ตัวอย่างอาหาร} = \frac{\text{MPN / กรัม ของ}}{\text{Faecal coliform หรือ Coliform หรือ } E. coli}$$

$$\text{ตัวอย่างน้ำ} = \frac{\text{MPN / 100 มิลลิลิตร}}{\text{Faecal coliform หรือ Coliform หรือ } E. coli}$$

การตรวจเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร

อุปกรณ์ในการเพาะแยกเชื้อ

- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เครื่องตีปั่น stomacher
- ขวดน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 และ 9 มิลลิลิตร
- Cooked Meat (CM) medium
- Tryptose-sulfite-cycloserine (TSC) agar + egg yolk emulsion
- จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
- ปิเปตปลอดเชื้อ ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- Anaerobic jar
- ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 35-37°C
- *C. perfringens* diagnostic antitoxin A
- แท่งแก้วรูปตัว L
- เข็มหรือลูปเขี่ยเชื้อ

การทดลองโดยการตรวจหาว่าพบหรือไม่พบเชื้อในตัวอย่างอาหาร

- เตรียมตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เทน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วย stomacher
- ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก 1-2 ระดับตามความเหมาะสมด้วยน้ำยาสำหรับเจือจาง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
- คูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในหลอด Cooked meat (CM) medium ซึ่งเพิ่งออกจาก ใหม่ๆ (ถ้าใช้ CM medium ที่เตรียมไว้นานแล้วอาจมีอากาศเข้าไปอยู่ในอาหาร ดังกล่าวเป็นปริมาณมาก ดังนั้นก่อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้นานนี้ ควรนำหลอดอาหารดังกล่าวไปทำการต้มในน้ำเดือด เพื่อไล่อากาศประมาณ 15 นาที ก่อนนำมาใช้) โดยใส่ตัวอย่างอาหารหลอดละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 หลอด
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- ใช้ลูปจุ่มเชื้อจากหลอด CM medium โดยพยายามเขี่ยเชื้อจากก้นหลอดของ CM medium (เนื่องจาก *C. perfringens* เป็นเชื้อในกลุ่ม facultative anaerobe ดังนั้นการเจริญของเชื้อมักจะอยู่ทางด้านก้นหลอด) นำมาถ่ายเพาะเชื้อบน TSC + egg yolk agar
- คั่วจานเพาะเชื้อนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปใส่ไว้ใน Anaerobic jar เพื่อ ขจัดออกซิเจนออกจาก anaerobic jar

- นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- ตรวจสอบจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีสีดำและมีโซนขุนขาวรอบๆ โคโลนี (opaque zone) เนื่องจาก lecithinase positive เหมือนกับ *S. aureus*
- นำลักษณะโคโลนีดังกล่าวไปทำการทดสอบยืนยัน โดยการทำปฏิกิริยา ที่เรียกว่า Nagler reaction test โดยปฏิบัติตามขั้นตอนดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น
- รายงานผลการตรวจพบเชื้อว่าพบหรือไม่พบจากตัวอย่าง 0.1, 0.01, หรือ 0.001 กรัม ตามระดับความเจือจางที่ได้ทำการปฏิบัติ

หมายเหตุ การตรวจหาในเชิงปริมาณอาจใช้วิธีการทาง Most Probable Number(MPN) แบบ 3 tube method ในการตรวจวิเคราะห์ โดยถ่ายตัวอย่างอาหาร 3 ระดับความเจือจางติดต่อกันลงในหลอด CM medium ระดับความเจือจางละ 3 หลอด บ่มเพาะเชื้อแล้วถ่ายเพาะเลี้ยงเชื้อบน TSC+egg yolk agar ดูลักษณะเฉพาะของโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปตรวจยืนยัน โดยทำ Nagler reaction test นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละระดับความเจือจางไป คำนวณหาค่า MPN จากตาราง 3 tube MPN รายงานผลการตรวจพบเชื้อเป็น MPN/ กรัม ของอาหาร

การตรวจหาเชื้อ *B. cereus* ในอาหาร

อุปกรณ์ในการเพาะเชื้อ

- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
- เครื่องตีปั่น stomacher
- ขวดน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาณ 225 และ 9 มิลลิลิตร
- ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1,5 และ 10 มิลลิลิตร
- Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar
- Trypticase soy-sheep blood agar
- แท่งแก้วรูปตัว L (spreader)
- ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 30°C
- เข็มเย็บเพาะเชื้อ (needle)

การทดลองและรายงานผลการตรวจนับเชื้อโดยวิธี spread plate technique

- เตรียมตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วย stomacher
- ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก 1-2 ระดับตามความเหมาะสมด้วยน้ำยาสำหรับเจือจาง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
- คูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานเพาะเชื้อ MYP agar ระดับความเจือจาง ละ 2 จานเพาะเชื้อจานเพาะเชื้อละ 1 มิลลิลิตร
- ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เคลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางให้ทั่วจาน
คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ตรวจนับโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะดังนี้ คือ โคโลนีสีชมพู เนื่องจากเชื้อดังกล่าวไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาล mannitol ให้เป็นกรดได้ โคโลนีที่เจริญบนอาหารนี้ยังคงมีชมพู เหมือนสีของอาหาร เพาะเลี้ยงเชื้อดังเดิมมี opaque zone รอบโคโลนี เนื่องจากเชื้อดังกล่าว มีเอนไซม์ lecithinase เช่นเดียวกับ *S. aureus* และ *C. perfringens* ดังนั้น เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเพาะเชื้อ MYP agar ซึ่งมีส่วน ผสมของ egg yolk อยู่ เอนไซม์ lecithinase จะไปทำปฏิกิริยากับเลซิทีนในไข่แดง ทำให้เกิดตะกอนขุ่น(opaque zone) รอบๆ โคโลนีของเชื้อ คล้าย *S. aureus* และ *C. perfringens* แต่สีของ Opaque จะยังคงเป็นสีชมพูเหมือนเดิม เหมือนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

- นำลักษณะโคโลนีดังกล่าวไปทำการตรวจยืนยันโดยดูปฏิกิริยา hemolytic activity test เพื่อดูการสลายเม็ดเลือดแดงของแฉะบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ (blood agar)
- นับจำนวนโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบ hemolytic positive ไปคำนวณหาปริมาณของเชื้อ *B. cereus* ต่อกรัมของตัวอย่างอาหาร

การทำปฏิกิริยา hemolytic activity test

- แบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 6 หรือ 8 ส่วน เท่าๆ กัน (ดังแผนภาพการตรวจหาเชื้อ *B. cereus*)
- ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *B. cereus* บน MYP agar ให้เชื้อติดที่ปลายเข็มเพียงเล็กน้อย
- นำเชื้อที่ติดอยู่ปลายเข็มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy sheep blood agar โดยแตะเชื้อลงบนผิวของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าว (1 ช่อง ต่อเชื้อ 1 โคโลนี)
- คำนวณเพาะเชื้อแล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ดูผลปฏิกิริยา hemolytic positive

การตรวจหาเชื้อ Salmonellae ในอาหาร

อุปกรณ์ในการเพาะเชื้อ

- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ
- หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 16 x 150 มม. ที่มีฝาหรือจุกสำลีปิดมิดชิด
- ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- กระจก slide
- Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
- Tetrathionate broth (TTB) + Iodine solution
- Selenite cystine broth (SCB)
- Salmonella-Shigella (SS) agar
- Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) agar
- Triple Sugar Iron (TSI) agar slant
- Lysine-Indole-Motility (LIM) medium
- Trypticase soy agar (TSA) หรือ Nutrient agar (NA) slants
- Agglutinating antiserum (polyvalent) A-67
- เข็ม (needle) และ หลวง (loop) เชื้อเชื้อ

การทดลองและรายงานผล

Pre-enrichment

- เตรียมตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (พลาสติก หรือ ถุงพลาสติกอุดจุกสำลี)
- เติม TSB 225 มิลลิลิตร เขย่าหรือปั่นให้ตัวอย่างอาหารกระจายในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB อย่างสม่ำเสมอ
- นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

Selective enrichment

- ใช้ปิเปตปลอดเชื้อถ่ายเพาะเชื้อจาก TSB ลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเหลวเพาะเชื้อ TTB (9 มิลลิลิตร) และ SCB (9 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร
- นำหลอดทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง plating on selective and differential media

- เชื้อเพาะเชื้อจากหลอด TTB และ SCB ลงบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อ SS และ XLD agar
คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- คุณลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อ SS และ XLD agar ซึ่งโคโลนีของ
ซาลโมเนลลาบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองจะมีลักษณะดังนี้
- SS agar ลักษณะโคโลนีของซาลโมเนลลาจะกลมใส มีหรือไม่มีจุดสีดำของการเกิด
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในโคโลนี
 - XLD agar ลักษณะโคโลนีจะกลมมีสีชมพู มีหรือไม่มีจุดโคโลนีสีดำของการเกิด
ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในโคโลนี

Biochemical screening test

- นำลักษณะเฉพาะของโคโลนีดังกล่าวในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการทดสอบปฏิกิริยา
ชีวเคมี โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อโคโลนีที่สงสัยไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI agar slants, LIM
medium และ TSA หรือ NA slant
- นำหลอดทดสอบทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
ดูผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIM medium ซึ่งเชื้อซาลโมเนลลาจะ
ให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

TSI				LIM		
Slant	butt	H ₂ S	gas	lysine	indole	motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

K = alkaline ปลายหลอด(slant) ของ TSI จะมีสีสีแดง (ชมพูบานเย็น)

A = acid ก้นหลอด(butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H₂S + = ในหลอด TSI จะเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนใหญ่ จะให้ผล+

H₂S - = ไม่มีตะกอนสีดำในหลอด TSI ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์

Gas+ = มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาล
กลูโคสแล้วได้กรดและก๊าซเพียงเล็กน้อย

Gas- = ไม่มีฟองอากาศให้เห็นในหลอด TSI ซึ่งมีบางเชืโรวารี่ให้ผล-

Lysine + = จะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อซาลโมเนลลามิเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย
lysine ทำให้ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้น มีผลทำให้ brom cresol purple ซึ่ง

ให้เป็น indicator ในอาหารดังกล่าวและมีสีม่วงที่พีเอชเป็นกลาง มีสีม่วงเข้มมากขึ้น ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีเอนไซม์ดังกล่าวนี้

Lysine - = หลอดอาหารจะมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อที่ไม่มี เอนไซม์ lysine decarboxylase แต่มีเอนไซม์ lysine decarboxylase ซึ่งจะไปย่อย lysine ทำให้พีเอชของอาหารต่ำลง มีผลทำให้สีม่วงของ brom cresol purple ไปเป็นสีเหลือง

Indole + = จะมีสีแดงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากหยดน้ำยา KOVAC

Indole - = ไม่เกิดสีแดงหลังจากหยดน้ำยา KOVAC ซึ่งซาลโมเนลลา จะไม่มี เอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ KOVAC

Motile + = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM จะขุ่นทั้งหลอด ทั้งนี้ เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้น เมื่อทำการ stab เชื้อลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM แล้วบ่มเพาะเชื้อซาลโมเนลลาจะเจริญเคลื่อนที่ออกจากรอย stab ไปทุกทิศทาง จึงทำให้หลอดขุ่น

Motile - = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีเชื้อเจริญบริเวณรอย stab เท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบ รอย stab จะใส ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ จึงเจริญอยู่เฉพาะบริเวณรอย stab จะใส ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ จึงเจริญอยู่เฉพาะบริเวณรอยซาลโมเนลลาไม่มีแฟลกเจลลาได้แก่ *S. pullorum* และ *S. gallinarum*

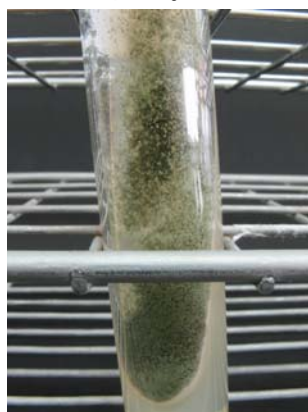
ภาคผนวก ข.

วิธีการหาปริมาณเชื้อตั้งต้นและเตรียมตัวอย่างในการศึกษาผลของ ความร้อนกับความเข้มข้นของโปตัสเซียมซอร์เบท

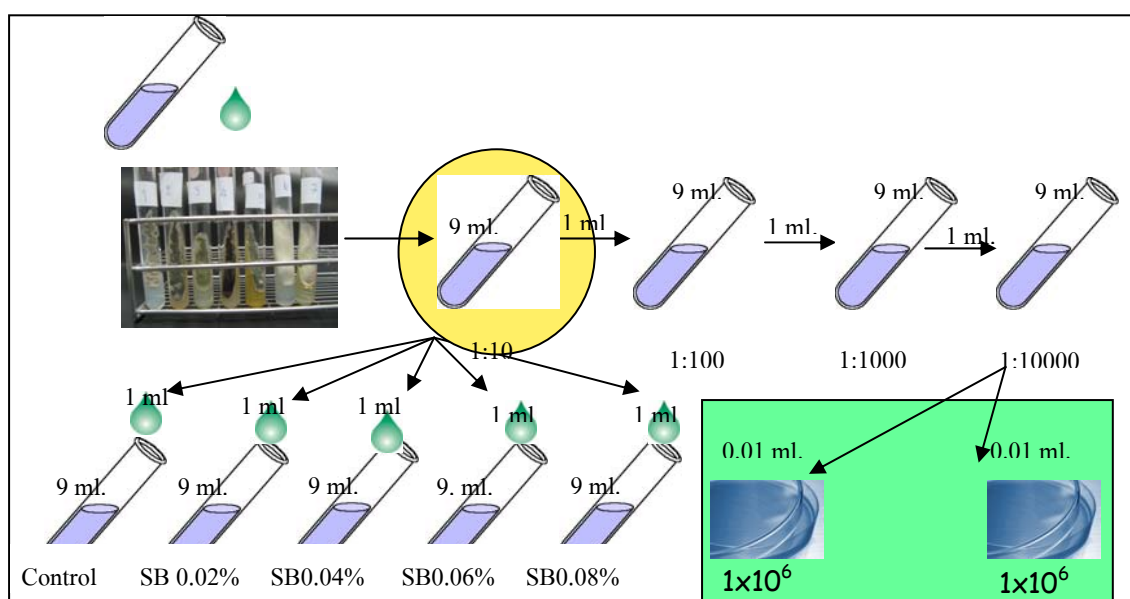
ข. 1. วิธีการหาปริมาณเชื้อตั้งต้น

การเตรียมเชื้อใน Potato Dextrose Agar (PDA)

เตรียม slant PDA 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง พร้อมนำเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมา ลาก
บนหน้า slant ให้เต็มโดยใช้ loop ปุ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน



รูปที่ ข.1.1 แสดงรูปตัวอย่างเชื้อราที่ขึ้นเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ ข.1.2 แสดงขั้นตอนการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและทดสอบกับความร้อนและความเข้มข้นของ
โปตัสเซียมซอร์เบท

การเตรียมระดับความเจือจาง (dilution)

1. นำ potato dextrose broth (PDB) 9 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในหลอดที่เตรียมเชื้อไว้ ดังรูปที่ ข.1.1
2. เกลี่ยเชื้อราให้ผสมใน PDB และเทสารละลาย PDB ที่ได้ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สารละลายที่มี ระดับความเจือจาง 10^{-1} (ดังรูปที่ ข.1.2)
3. นำมาทำระดับความเจือจางที่ ถึง 10^{-4} และ หยดด้วย ไมโครปิเปต 0.01 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) c]h;ทำการ spread plate
4. บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง อ่านและแปลผล
5. ในขณะเดียวกันให้นำหลอดที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} มาหยดลงใน PDB 9 มิลลิลิตร ที่มีโปตัสเซียมซอร์เบทที่ระดับความเข้มข้น 0.02%, 0.04%, 0.06% และ 0.08% และควบคุมโดยไม่ใส่โปตัสเซียซอร์เบท
6. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C และ ทุกๆ 15 นาที นำมาตรวจเชื้อ เพื่อดูปริมาณที่ลดลง
7. โดยทำการหยด 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารแข็ง PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง
8. ทำการอ่านผลเชื้อและแปลผล

- ข้อควรระวัง 1. ต้องทำอย่างปลอดภัย เนื่องจากเชื้อรามีการปนเปื้อนได้ง่าย
2. หากบ่มนานเกินไป เชื้อราจะกระจายจนไม่สามารถนับได้