การศึกษาผลของพีเอชต่อการตรวจพบซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด

Effect of pH on Salmonella Detection in Nham Sold in Retailed Market

โดย

อดิศร เสวตวิวัฒน์

รายงานผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้ของ

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

แหนม อาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทย ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมต่อการบริโภคของประชาชนชาวไทยทั่วทุกภาคของประเทศ และการบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมักจะบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อนหลังจากการหมักส่วนผสมของแหนมดิบได้ 2-3 วัน โดยมีระดับพีเอชและค่าปริมาณกรดที่คิดเป็นร้อยละของกรดแลกติกที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสูตรส่วนผสมของการผลิต รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักแหนมก่อนจำหน่ายสู่ผู้บริโภค เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการผลิตทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมครัวเรือนและอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ มีการรับหมูที่มาทำการแปรรูปจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการสุขาภิบาลของโรงฆ่าที่แตกต่างกัน อีกทั้งการควบคุมคุณภาพจนถึงสุขลักษณะการผลิตของการผลิตในรูปแบบของอุตสาหกรรมทั้งสองที่มีความแตกต่างกัน จึงเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น ซาลโมเนลลา และเชื้อโรคอื่นเป็นจำนวนมาก (ดวงดาว และคณะ, 2537; อดิศร และ อรุณ, 2539; อดิศร และคณะ, 2538)

เนื่องจากผลิตภัณฑ์แหนมเป็นผลิตภัณฑ์หมักพื้นเมืองของไทยที่ผู้บริโภคนิยมบริโภคในขณะที่พีเอชต่ำ (ประมาณ 4.5) มีรสเปรี้ยว ซึ่งยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น ซาลโมเนลลา ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังไม่มีมาตรฐานกำหนดที่แน่นอน จึงมักใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ตามผลิตภัณฑ์หมักประเภทเนื้อตามมาตรฐานของต่างประเทศ ซึ่งมีค่าพีเอชไม่ต่ำมาก (สูงกว่า 5) และมีวิธีการในการตรวจสอบในขั้นตอนต่าง ๆ หลายรูปแบบ รวมถึงอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ในขั้นตอน selective enrichment และ isolation มีหลายชนิด ดังนั้น การวิจัยในหัวข้อดังกล่าวจึงกำหนดขึ้นเพื่อเปรียบเทียบหาชนิดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในทั้งสองขั้นตอนที่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารหมักประเภทเนื้อที่มีความเป็นกรดสูง พีเอชต่ำ ทั้งนี้ เพื่อเป็นข้อมูลในด้านการระบาดของเชื้อซาลโมเนลลา รวมทั้งเป็นข้อมูลดูผลของพีเอชต่อการตรวจพบเชื้อและการเลือกใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการหาเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักไทยและอาหารหมักอื่นที่ใกล้เคียง นอกจากนี้ ผลการวิจัยดังกล่าวยังสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุน รองรับการตั้งมาตรฐานของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานวิธีวิเคราะห์หาเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์หมักประเภทเนื้อนี้ของไทยในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการระบาดของเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร
2. เพื่อศึกษาหาเปอร์เซ็นต์กรดและค่าพีเอชของแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดที่มีผลต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา
3. เพื่อศึกษาหาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมในขั้นตอน selective enrichment และ isolation
4. ผลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนเพื่อรองรับการตั้งมาตรฐานของผลิตภัณฑ์และมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์แหนมและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพื้นเมืองอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงให้กับหน่วยงานของไทยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักแหนม

การผลิตแหนมเป็นกระบวนการหมักที่วัตถุดิบหลัก เช่น หมู ไม่สามารถผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อเพื่อฆ่าเชื้อให้หมดก่อนการหมักได้ ดังนั้น จะพบว่ามีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในหมู รวมถึงจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับกระเทียมสับส่วนประกอบอื่นที่ไม่ผ่านความร้อนได้ และจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเหล่านี้ สามารถเจริญได้ในระหว่างการหมัก ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ จุลินทรีย์ที่มีเกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนมนี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1.1 จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการให้เจริญในระหว่างหมักผลิตภัณฑ์ (Desirable microorganisms) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเป็นกลุ่มที่สำคัญในกระบวนการหมักแหนมและอาหารหมักหลายชนิด มีรายงานว่า แบคทีเรียแลกติกที่สำคัญและเกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนม เป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp. (สมบุญ, 2518) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่โดยปกติสามารถพบได้ในเนื้อสัตว์ดิบตามธรรมชาติ ผลไม้สด รวมถึงเครื่องเทศ เช่น พริกสด กระเทียมสด เป็นต้น เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือหรือน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป รวมถึงทนต่อสารยับยั้งจากกระเทียมสับ (allicin) และสารที่ใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น ดินประสิว (ไนเตรท) หรือ ไนไตรท์ได้ดี (อดิศร, 2542; Dababneh และ Al-Delaimy, 1984; Swetwawathana และคณะ, 1999 a; Swetwiwathana และคณะ, 1999 b) ดังนั้นในผลิตภัณฑ์แหนม ซึ่งมีการเติมกระเทียม เกลือ ดินประสิว หรือวัตถุปรุงแต่งในกลุ่มไนไตรท์ จะไม่มีผลต่อกระบวนการหมักจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวระหว่างการหมักแหนม นอกจากนั้น เมื่อส่วนผสมแหนมมีการอัดรัดให้แน่นในหลอดพลาสติกหรือรัดให้แน่นด้วยหนังยางหรือเชือกหลังจากบรรจุในถุงพลาสติกหรือใบตองแล้ว จะยิ่งสนับสนุนให้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกเจริญได้ดีขึ้น เนื่องจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวเป็นเชื้อที่เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศต่ำ ซึ่งสภาพการอัดหรือรัดส่วนผสมแหนมให้แน่นและสารต่าง ๆ ที่เป็นส่วนผสม ไม่ว่าจะเป็นกระเทียมสับ เกลือ หรือวัตถุปรุงแต่งอาหารนานาชนิดดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนอกจากจะช่วยสนับสนุนเชื้อในกลุ่มที่เราต้องการให้เกิดผลิตภัณฑ์แหนมแล้ว สภาพการหมักและส่วนผสมดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่อาจเจริญในระหว่างการหมักแหนมด้วย (อดิศร, 2542; Swetwiwathana และคณะ, 1999 b)

1.2 จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย (Spoilage microorganisms) จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อหมูสำหรับใช้ในการผลิตแหนมมีมากมายหลายชนิด โดยมากมักเป็นเชื้อในกลุ่มที่ต้องการอากาศ เช่น Pseudomonad, Moraxella, Alcaligenes, Coliforms เป็นต้น (Jay, 1992) ซึ่งเชื้อในกลุ่มดังกล่าวสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่หลากหลาย ดังนั้น ในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนม มักจะใช้หมูสดที่ไม่เก็บไว้นานในการผลิต โดยใช้หมูส่วนที่เป็นเนื้อเลาะเอามันออกให้มากที่สุดก่อนนำส่วนเนื้อไปบด ถ้ามีการล้างทำความสะอาดหมูทั้งชิ้นก่อนบด ควรใช้ผ้าสะอาดซับหมูชิ้นที่ผ่านการล้างน้ำนั้นให้แห้งก่อนทำการบด ไม่เช่นนั้นจะเป็นการเพิ่มน้ำให้กับส่วนผสมแหนม ทำให้มีน้ำอิสระ (free water) หรือมีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water activity, aw) ที่สูงขึ้น ซึ่งน้ำอิสระที่มีมากนี้จะไปทำให้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มจำนวนได้เร็วในช่วงต้นของการหมักแหนม ทำให้แหนมเน่าเหม็นและเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่เราต้องการไม่สามารถเจริญขึ้นได้ เพราะสารอาหารในส่วนผสมแหนมถูกเชื้อกลุ่มที่ทำให้อาหารห้เสื่อมเสียแย่งใช้ไปในช่วงต้นของการหมัก การชับหมูให้แห้งก่อนบดจะช่วยลดปริมาณน้ำที่มีในส่วนผสมแหนมจะทำให้ประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่ได้จากกระเทียมสับและวัตถุปรุงแต่งอาหารพวกเกลือ น้ำตาล ดินประสิว ไนไตรท์ ส่งผลในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสียนี้ได้ดี

1.3 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic microorganisms) เชื้อในกลุ่มสำหรับในเนื้อหมูที่สำคัญคือเชื้อในกลุ่มแบคทีเรีย รวมทั้งไข่พยาธิที่อาจพบตามกล้ามเนื้อหมู เช่น ไข่พยาธิตัวตืด (*Taenia solium*) ไข่พยาธิตัวกลม (*Trichinella spiralis*) เป็นต้น (Jay, 1992) ซึ่งการป้องกันในเรื่องของการปนเปื้อนของไข่พยาธิในผลิตภัณฑ์แหนมนั้น ได้มีการแนะนำให้โรงงานผลิตแหนมสั่งซื้อเนื้อหมูที่จะใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตแหนมจากแหล่งฆ่าที่น่าเชื่อถือ โดยหมูที่จะนำมาฆ่าเพื่อจำหน่ายต้องผ่านการควบคุมการเลี้ยงจากฟาร์มที่สะอาด มีสัตวแพทย์ควบคุม จะสามารถลดปัญหาในเรื่องของไข่พยาธิปนเปื้อนในเนื้อหมูได้ระดับหนึ่ง สำหรับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียจะเป็นเรื่องที่ควบคุมได้ค่อนข้างยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียลำไส้ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในกลุ่มซาลโมเนลลา ดังมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนมากในเนื้อหมูสดที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ (Swabenburg และคณะ, 2001; Thorberg และ Engvall, 2001; Rose และคณะ, 2002; Botteldoorn และคณะ, 2003) ซึ่งมีผลรวมไปถึงการตรวจพบเชื้อกลุ่มดังกล่าวเป็นจำนวนมากในผลิตภัณฑ์แหนมที่วางขายตามท้องตลาดทั่วไป (อดิศร และ อรุณ, 2539; Lotong และ Swetwiwathana, 1990) และจากการศึกษาการองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เป็นส่วนผสมในการหมักแหนมของ Swetwiwathana และคณะ (1999 b) พบว่า กระเทียมสับและไนไตรท์ปริมาณ 125 พีพีเอมที่ใส่ในส่วนผสมแหนมก่อนการหมัก จะมีผลในการยับยั้งการเจริญในช่วงต้นของการเกิดการหมักแหนม ซึ่งถ้าแหนมที่ผลิตมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกมากและสามารถผลิตกรดแลกติกได้เร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมักแหนม ยิ่งจะทำให้การยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในกลุ่มดังกล่าวมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ดังนั้น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกในส่วนผสมแหนมก่อนการหมัก จะส่งเสริมให้เชื้อนี้เจริญได้เร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก เมื่อความเป็นกรดที่เกิดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ร่วมกับสารยับยั้งที่ได้จากกระเทียมสับและไนไตรท์ ยิ่งทำให้อำนาจการทำลายเชื้อของซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2.2 การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารโดยวิธีมาตรฐานสากล

การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารเริ่มโดยพัฒนาจากวิธีการตรวจเชื้อจากผู้ป่วย โดยบ่มตัวอย่างอาหารในอาหารขั้นตอน selective enrichment เช่น selenite cystine broth (SCB) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเขี่ยเพาะเชื้อบน selective plating medium แล้วจึงแยกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตามแต่ชนิดของ selective plating medium ที่ใช้เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทำการตรวจสอบยืนยันเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาด้วยการตกตะกอนกับ antiserum ของซาลโมเนลลา ซึ่งการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารนั้นได้มีการทำวิจัยและศึกษาเพิ่มมากขึ้นในระยะเวลาต่อมา จนพบว่าวิธีที่ใช้ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในอาหารตามการตรวจเชื้อจากผู้ป่วยนั้นไม่เหมาะสม เนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบของ selective enrichment medium เช่น selenite ใน SCB และสารอื่น ๆ จะเป็นพิษต่อเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารที่จะทำการตรวจสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อที่ได้รับบาดเจ็บ (injury cells) จากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยวิธีต่าง ๆ เช่น การผ่านความร้อน การทำแห้ง การอาบรังสี การแช่แข็ง หรืออาหารที่มีสภาพความเป็นกรดสูง พีเอชต่ำ ซึ่งเมื่อนำอาหารที่มีเชื้อซาลโมเนลลาปนเปื้อนและผ่านการแปรรูปดังกล่าวมาทำการเพาะหาเชื้อใน selective enrichment medium โดยตรง จะทำให้เชื้อซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บอยู่ตายไปและตรวจไม่พบ (Thatcher และ Clark, 1968; Patil และ Parhad, 1986) จึงได้มีการเพิ่มขั้นตอนการวิเคราะห์โดยใช้ non-selective enrichment หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า preenrichment (การพรีเอนริช) กับอาหารที่ผ่านการแปรรูป ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บในตัวอย่างอาหารที่ทำการตรวจวิเคราะห์นั้นแข็งแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าวก่อนที่จะถ่ายใส่ในอาหารเพาะเชื้อในขั้นตอน selective enrichment ทำให้โอกาสในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารที่ผ่านการแปรรูปมีมากยิ่งขึ้น (Thatcher และ Clark, 1968)

การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นอาหารที่ผ่านการแปรรูป หรือแม้แต่วัตถุดิบในการผลิตอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์สดที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาและเชื้ออื่น ๆ เช่น โคลิฟอร์ม pseudomonads เป็นต้น อยู่ในปริมาณสูง การเพิ่มขั้นตอนพรีเอนริชในการตรวจหาซาลโมเนลลาในวัตถุดิบดังกล่าวทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อสูงขึ้นกว่าการตรวจโดยใช้ selective enrichment medium โดยตรง ดังนั้น การตรวจหาซาลโมเนลลาในอาหารโดยวิธีมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) (USFDA, 1995) และ The AOAC Official Methods of Analysis (AOAC International, 1995) จึงได้กำหนดการตรวจวิเคราะห์ซาลโมเนลลาในอาหารไว้ 5 ขั้นตอน ที่สำคัญ คือ

2.2.1 การพรีเอนริช (Preenrichment) เป็นขั้นตอนที่เพิ่มขึ้นเพื่อให้เชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารที่มีอยู่ในรูปเซลบาดเจ็บหรือมีปริมาณน้อยให้มีโอกาสฟื้นตัวจนแข็งแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้น จนมีโอกาสตรวจพบสูง ซึ่งขั้นตอนนี้ เชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนจะสามารถเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นได้เช่นกัน เนื่องจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าวไม่มีสารยับยั้งใด ๆ แต่เชื้ออื่นที่เจริญและเป็นคู่แข่งการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาในขั้นตอนนี้จะถูกยับยั้งการเจริญในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) เป็นขั้นตอนที่ต่อจากขั้นตอนการพรีเอนริช โดยทำการถ่ายเชื้อจากการพรีเอนริชมาใส่ลงในอาหารเหลวที่มีสารยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ ที่เจริญแข่งกับเชื้อซาลโมเนลลา โดยที่เชื้อซาลโมเนลลาที่แข็งแรงจากขั้นตอนการพรีเอนริชจะสามารถทนต่อสารยับยั้งที่มีในอาหารเหลวของขั้นตอนดังกล่าวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าแบคทีเรียคู่แข่งอื่น ๆ ในอาหารเหลวของขั้นตอนนี้ สารยับยั้งในอาหารเหลวที่ใช้ในขั้นตอนนี้มักเช่น sodium selenite ใน SCB หรือ tetrathionate และ brilliant green หรือ iodineในอาหารเหลว tetrathionate broth (TTB) และ Rappaport-Vassiliadis (RV) medium เป็นต้น และเนื่องจากซาลโมเนลลาที่พบในปัจจุบันมีมากกว่า 2,500 เซโรวาร์ (Popoff และคณะ, 2001) ซึ่งเชื้อแต่ละเซโรวาร์จะทนสารยับยั้งที่ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าวได้ไม่เหมือนกัน เช่น tetrathionate ใน TTB จะเป็นพิษต่อเชื้อ *S.* Abortus-ovis ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในอาหารและการตรวจวิเคราะห์ใช้ TTB เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment เพียงอย่างเดียว จะทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้จากตัวอย่างอาหาร ด้วยเหตุนี้ มาตรฐานการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารโดยทั่วไป จึงได้แนะนำให้ใช้อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment มากกว่า 1 ชนิด กล่าวคือ ควรใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าวอย่างน้อย 2 ชนิด ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความมั่นใจการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหาร และส่งผลถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทางอ้อมด้วย

2.2.3 อาหารแข็งเพาะแยกเชื้อจำเพาะ (Selective plating medium หรือ differential selective medium) เป็นการคัดแยกเชื้อในกลุ่มที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment ซึ่งขั้นตอนนี้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียลำไส้ (enteric bacteria) ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในอาหารและสามารถทนต่อสารยับยั้งในอาหารของ selective enrichment รวมถึงซาลโมเนลลาที่มีปริมาณมากขึ้นจะสามารถทนสารบางอย่าง เช่น bile salts, desoxycholate เป็นต้น ที่มีอยู่ในอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อจำเพาะในขั้นตอนนี้และเจริญขึ้นเป็นโคโลนีให้เห็นเด่นชัดบนอาหารแข็งเพาะเชื้อ ซึ่งลักษณะโคโลนีของซาลโมเนลลาที่ปรากฏบนอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อจำเพาะนี้ จะแตกต่างกับเชื้อโรคลำไส้อื่น โดยมากจะอาศัยหลักการแยกเชื้อในกลุ่มที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลกโตส (lactose fermenters) ที่มีในอาหารกับกลุ่มที่ไม่ย่อยน้ำตาลแลกโตส (non-lactose fermenters) เชื้อในกลุ่มหมักย่อยน้ำตาลแลกโตสมักได้แก่ โคลิฟอร์ม, *E. coli, Klebsiella* spp. เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่ไม่หมักย่อยน้ำตาลแลกโตส ได้แก่ ซาลโมเนลลา, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. เป็นต้น ดังนั้นอาหารที่ใช้แยกเชื้อในลักษณะดังกล่าวจึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า **differential selective medium** ซึ่งอาหารในขั้นตอนนี้มีผลิตเพื่อจำหน่ายในลักษณะอาหารสำเร็จรูปพร้อมใช้ทางการค้าอยู่หลายชนิด เช่น Salmonella-Shigella (SS) agar, Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, Bismuth sulfite (BS) agar เป็นต้น ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับที่กล่าวในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment คือ เนื่องจากซาลโมเนลลาในปัจจุบันมีอยู่หลายพันเซโรวาร์ แต่ละเซโรวาร์จะมีความสามารถทนสารยับยั้งที่ใส่ในอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อของขั้นตอนดังกล่าวแตกต่างกัน ดังนั้นมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซาลโมเนลลาในขั้นตอนนี้จึงได้แนะนำให้ทำการเพาะแยกเชื้อบนอาหารแข็งเพาะแยกเชื้ออย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไป ทั้งนี้เพื่อความมั่นใจต่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร รวมถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคโดยทางอ้อม

2.2.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical screening test) เป็นการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลา ทั้งนี้เนื่องจากว่าในอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อ differential medium แต่ละชนิดนั้นจะมีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียลำไส้ที่ให้ลักษณะโคโลนีคล้ายซาลโมเนลลามาก เช่น *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. เป็นต้น ดังนั้น การดูเฉพาะลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อจึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าพบซาลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารนั้นหรือไม่ ขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนการตรวจสอบอย่างคร่าว ๆ ว่ามีแนวโน้มที่จะพบเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารหรือไม่ ซึ่งขั้นตอนในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อนี้มักนิยมใช้ Triple sugar iron (TSI) agar slants ควบคู่กับการใช้ Lysine iron agar (LIA) agar slants หรือ Lysine-indole-motility (LIM) medium ในการทดสอบขั้นเบื้องต้น

2.2.5 การตรวจยืนยันคุณสมบัติทางเซโรโลยี (Serological confirmation) เป็นขั้นตอนทดสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลาหรือไม่ และอาจบอกได้ว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลาในกลุ่มหรือเซโรวาร์ไหน ซึ่งการทดสอบจะคัดหลอดเชื้อจากขั้นตอน biochemical screening test ที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลามาทำปฏิกริยากับ agglutinating polyvalent O และ polyvalent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H antisera โดยดูการเกิดตะกอน (agglutination) ของเชื้อกับ antiserum บนกระจกสไลด์ ซึ่งถ้าพบว่ามีตะกอนเกิดขึ้นจะทำการทดสอบต่อโดยใช้ group-specific O และ H antisera เพื่อทำการแยกกลุ่มของเชื้อซาลโมเนลลาต่อไป

USFDA (1995) และ AOAC International (1995) ได้ระบุถึงความสำคัญของขั้นตอน Preenrichment, Selective enrichment และ Selective plating เพื่อที่จะให้เชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในอาหารไม่ว่าจะอยู่ในลักษณะเซลล์ที่บาดเจ็บจากกระบวนการผลิตหรือมีปริมาณน้อยมีโอกาสเจริญได้ดีในช่วง Preenrichment และ Selective enrichment จนกระทั่งสามารถตรวจพบได้เป็นโคโลนีให้เห็นเด่นชัดในขั้นตอน Selective plating ซึ่งในขั้นตอน pre-enrichment นั้น มีอาหารหลายชนิดให้เลือก ซึ่งโดยมากจะมุ่งเน้นให้เชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนและอยู่ในลักษณะเซลล์ที่บาดเจ็บหรือมีปริมาณการปนเปื้อนน้อยให้อยู่ในลักษณะเซลล์ที่แข็งแรงและเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากก่อนที่จะถ่ายลงสู่ขั้นตอน Selective enrichment เพื่อลดปริมาณเชื้อคู่แข็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเจริญขึ้นพร้อมกับซาลโมเนลลาในช่วงของการพรีเอนริช และขั้นตอน Selective enrichment นี้ เชื้อซาลโมเนลลาที่แข็งแรงจะสามารถทนต่อสารยับยั้งต่าง ๆ ที่มีในอาหารและเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี เมื่อนำอาหารในขั้นตอนดังกล่าวไปทำการเพาะเชื้อในอาหารของขั้นตอน Selective plating จะทำให้โอกาสการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาเพิ่มมากขึ้น

อาหารในขั้นตอน Preenrichment ที่แนะนำให้ใช้ โดยมากได้แก่ Buffered Peptone Water (BPW), Trypticase Soy Broth (TSB) หรือ Nutrient broth (NB) เป็นต้น ส่วนอาหารในขั้นตอน Selective enrichment แต่เดิมนั้น ได้มีการแนะนำให้ใช้ selenite cystine broth (SCB) และ tetrathionate broth (TTB) โดยใช้อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในการบ่มเพาะเชื้อ แต่จากการศึกษาของ June และคณะ (1995 และ 1996) พบว่า การใช้ Rappaport-Vassiliadis (RV) medium บ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลในการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาและการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูงกว่า SCB มาก และการใช้ SCB นั้น พบว่าหลังการใช้ จะมีปริมาณของ selenium ตกค้างสูง ซึ่งสาร selenium ที่เกิดขึ้น จัดเป็นสารที่อันตรายและมีค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัด และถ้ามีการกำจัดที่ไม่ถูกวิธีแล้ว จะทำให้เกิดการกระจายสู่สภาพแวดล้อม จนอาจเกิดผลเสียต่อการปฏิสัตว์ของบริเวณใกล้เคียงได้ (อ้างโดย Hammack และคณะ, 1999) ด้วยเหตุนี้ การตรวจหาซาลโมเนลลาในอาหารสำหรับขั้นตอนดังกล่าวของ BAM และ AOAC จึงได้ทำการใช้ RV medium บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แทน SC broth ตั้งแต่ ปีค.ศ. 1995 เป็นต้นมา สำหรับ TT broth นั้น ยังแนะนำให้ใช้ควบคู่กับ RV medium โดยที่อาหารที่มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อต่ำนั้น ได้มีการแนะนำให้ใช้ TT broth บ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคู่กับ RV medium บ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อสูงได้มีการแนะนำให้ใช้ TT broth บ่มที่อุณหภูมิ 43° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคู่กับ RV medium บ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Hammack และคณะ, 1999)

สำหรับอาหารในขั้นตอน Selective plating นั้น ทั้ง BAM และ AOAC ได้แนะนำให้มีการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าว 3 ชนิด ได้แก่ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar และ Bismuth sulfite (BS) agar ทั้งนี้เพื่อให้การตรวจพบเชื้อในกลุ่มซาลโมเนลลาที่มีสมาชิกอยู่รวม มากกว่า 2,500 เซโรวาร์ (Popoff และคณะ, 2001) ในอาหารมีโอกาสตรวจพบได้โดยไม่ผิดพลาดและมีโอกาสที่จะได้เซโรวาร์มากที่สุด ด้วยเหตุนี้อาหารในขั้นตอนดังกล่าวจึงเป็นที่สนใจต่อนักวิจัยหลายท่านที่จะศึกษาหาสูตรอาหารชนิดใหม่ที่จะส่งเสริมการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเนลลาให้ได้ผลการตรวจที่แน่นอน แม่นยำ และมีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ เช่น Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium ซึ่งมีความไว (semsitivity) และมีความจำเพาะสูง (high specificity) อีกทั้งราคายังถูกกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาอื่นอีกหลายชนิด (O'Donoghue และคณะ, 1993) ประสิทธิภาพของอาหารเพาะเชื้อดังกล่าวเป็นที่ยอมรับในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารของคณะกรรมการ AOAC ในเดือนมิถุนายน ค.ศ. 1995 และได้รับการตีพิมพ์ในเอกสารการตรวจวิเคราะห์ของ AOAC ในหัวข้อ 995.07 (Smedt, 1998)

2.3 การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม

ดังได้กล่าวในข้างต้นแล้วว่า ซาลโมเนลลา เป็นเชื้อที่ตรวจพบมากในผลิตภัณฑ์แหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด การตรวจหาเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์แหนมได้มีรายงานการศึกษามาเป็นเวลานาน วิธีการตรวจวิเคราะห์มักจะอ้างอิงวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐานสากล เช่น AOAC, BAM โดยแต่เดิม อาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณสูง เช่น หมูสด ไก่สด เนื้อวัวสด เป็นต้น สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment โดยตรง ก่อนที่จะทำการคัดแยกเชื้อในขั้นตอน isolation on selective plating medium แล้วนำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลาบนอาหาร selective plating medium ไปทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในขั้นตอน biochemical test ก่อนที่จะทำตรวจสอบยืนยันด้วย serological test ด้วย polyvalent antiserum ของเชื้อในกลุ่ม ซาลโมเนลลาทั้งหมด แต่ถ้าอาหารที่ผ่านการแปรรูปในกระบวนการต่าง ๆ การตรวจหาเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ควรจะมีการพรีเอนริชในอาหารที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อน ทั้งนี้เนื่องจากว่าอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปอาจไม่สามารถทำลายเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ก่อนการแปรรูปให้หมดไปได้ และซาลโมเนลลาที่หลงเหลืออยู่อาจมีปริมาณน้อยและอยู่ในรูปเซลบาดเจ็บ การเพิ่มขั้นตอนพรีเอนริชจะเป็นการปรับสภาพเซลซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บและอาจมีปริมาณน้อยในผลิตภัณฑ์ มีสภาพที่แข็งแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในขั้นตอน selective enrichment เพื่อเพิ่มจำนวนซาลโมเนลลาในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อของขั้นตอนดังกล่าวและลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียคู่แข่งที่เจริญเพิ่มจำนวนในช่วงการพรีเอนริช ทำให้โอกาสตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารเพิ่มมากขึ้นกว่าการนำอาหารใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment โดยตรง เนื่องจากสารยับยั้งในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนดังกล่าว จะยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลลาในกลุ่มที่บาดเจ็บ ทำให้การตรวจพบซาลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารลดน้อยลง

สำหรับประเทศไทยวิธีการตรวจหาเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างแหนมในอดีตได้ใช้ตัวอย่างแหนมใส่เพาะเชื้อลงใน selenite cystein broth (SCB) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อซาลโมเนลลาขั้นตอน selective enrichment โดยตรง (สุขใจ, 2525) ต่อมา อดิศร และ นภา (2534) ได้รายงานการตรวจพบปัญหาการบาดเจ็บของเซล (Injury cells) ของเชื้อซาลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนมที่มีสภาวะความเป็นกรดสูง พีเอชต่ำ ซึ่งการบาดเจ็บของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์แหนม ถ้านำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร selective enrichment เช่น SCB โดยตรง มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การตรวจพบซาลโมเนลลาลดน้อยลง ซึ่งผู้วิจัยได้รายงานถึงข้อดีของการใช้อาหารพรีเอนริช (preenrichment medium) เช่น trypticase soy broth (TSB) เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อซาลโมเนลลาที่เกิดการบาดเจ็บและมีปริมาณน้อยในผลิตภัณฑ์แหนมให้แข็งแรงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในขั้นตอนดังกล่าวก่อนที่จะถ่ายเชื้อลงสู่ขั้นตอน selective enrichment เพื่อคัดแยกเชื้อซาลโมเนลลาต่อไป โดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58921

ใช้ TSB เป็นอาหารพรีเอนริชในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม จะให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลามากกว่าการใช้ lactose broth (LB) เป็นพรีเอนริช และ การตรวจหาโดยใช้ SCB ซึ่งเป็นอาหารในขั้นตอน selective enrichment โดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง TSB ที่มีการเติมสาร dipotassium phosphate ซึ่งเป็นสารพวก buffering agent มีผลทำให้ช่วยปรับสภาพพีเอชช่วงเบื้องต้นของการบ่มตัวอย่างแหนมที่มีพีเอชต่ำกว่า 5.0 ในอาหารพรีเอนริชดังกล่าวให้สูงขึ้นกว่าพีเอช 5.0 ยังผลให้เซลซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บในสภาวะที่พีเอชต่ำ มีความเป็นกรดสูงในแหนม มีโอกาสฟื้นตัวและเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นในอาหาร TSB ผู้วิจัยยังได้แนะนำถึงการเลือกอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนพรีเอนริชสำหรับตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงพีเอชต่ำ รวมถึงอาหารหมักที่มีความเป็นกรดสูงว่า ควรใช้อาหารที่มีสารในกลุ่ม buffering agent เป็นองค์ประกอบ ซึ่งในปัจจุบันได้มีบริษัทหลายแห่งผลิตอาหารสำเร็จรูปสำหรับการพรีเอนริชหาซาลโมเนลลาโดยเติมองค์ประกอบของสารดังกล่าวที่นอกเหนือจาก TSB แล้ว จะพบว่า Buffered Peptone Water (BPW) เป็นอาหารเพาะเชื้อในขั้นตอนพรีเอนริชที่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในอาหารในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างแหนมพร้อมบริโภคจำนวน 55 ตัวอย่างที่จำหน่ายบริเวณตลาดสดและห้างสะดวกซื้อในเขตลาดกระบัง และห้างสรรพสินค้าและตลาดสดในเขตอำเภอเมืองจังหวัดนนทบุรี

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการไดเตรทหาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก

- สารละลายฟีนอฟธาลีน
- สารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH
- KOVAC reagent

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Buffered Peptone Water (BPW)
- Tetrathionate broth (TTB) + Iodine solution
- Rappaport Vassiliadis (RV)
- Xylose-Lysine-Desoxycholate(XLD)agar
- Modified Sami-Solid Rappaport Vassiliadis (MSRV)
- Hektoen (HE) agar
- Triple Sugar Iron (TSI) agar slant
- Lysine-Indole-Motility (LIM) medium
- Trypticase soy agar(TSA) หรือ Nutrient agar(NA) slant
- Agglutinating antiserum (polyvalent)A-67, A-I, Group B, C, D และ E

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม

- เครื่องตีบดอาหาร stomacher
- ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 35 – 37°ซ
- water bath ควบคุมอุณหภูมิ 42°ซ
- ตู้อบลมร้อน
- autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เครื่องแก้วปราศจากเชื้อ (จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง และ ปิเปต)
- เครื่องชั่งสาร
- ห่วง (loop) และเข็ม (needle) สำหรับเขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงแกส

3.2.2 อุปกรณ์ในการไตเตรทหาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกในแหนม

- บิวเรต
- แฟลกฟลาส์กรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2.3 อุปกรณ์ในการวัดค่าพีเอชของแหนม

- pH meter model SUNTEX pH/mV/TEMP METER SP-701

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สุ่มซื้อตัวอย่างแหนมพร้อมบริโภคจำนวน 50 ตัวอย่างที่จำหน่ายบริเวณตลาดสดและห้างสะดวกซื้อในเขตหัวตะเข้ และห้างสรรพสินค้าและตลาดสดในเขตอำเภอเมืองจังหวัดนนทบุรี ตัวอย่างละ 2 หน่วย บรรจุในกระติกเก็บตัวอย่างรักษาความเย็นด้วยน้ำแข็งแห้ง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่าต่าง ๆ ของตัวอย่างที่จะทำการศึกษาจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแหนม จนกระทั่งทำการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3.3.2 ศึกษาหาค่าพีเอช (pH) ของตัวอย่างแหนมที่ทำการวิเคราะห์หาซาลโมเนลลา (Lotong และ Swetwiwathana, 1990)

สุ่มตัวอย่างแหนมพร้อมบริโภคใส่ลงในถุงพลาสติกใสให้ได้น้ำหนัก 20 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้มือบีบตัวอย่างแหนมและน้ำให้เข้ากัน นำส่วนที่เป็นน้ำมาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter บันทึกผลการทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติคจากตัวอย่างแหนม (Lotong และ Swetwiwathana, 1990)

สุ่มชั่งตัวอย่างแหนม 3 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์ 50 มล. จากนั้นปั่นให้ละเอียด แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด นำไปไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point(เกิดสีชมพู) บันทึกปริมาตร 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างจนเกิดสีชมพู นำปริมาตรที่ได้ไปทำการคำนวณหาปริมาณกรดแลคติคตามสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์กรดแลคติค} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1{,}000 \times \text{กรัมของตัวอย่าง}}$$

โดยที่ N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต(มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 วิธีการตรวจเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนม (USFDA, 1995; AOAC International ,1995)

ในการทดลองนี้ใช้วิธี Standard conventional method (SCM) (ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยแบ่งเป็น 8 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : ชั่งตัวอย่างแหนม ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุง Stomacher ปราศจากเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 : เติม Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างกระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW อย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่อง Stomacher

ขั้นตอนที่ 3 : นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ขั้นตอนดังกล่าวจัดเป็นขั้นตอน Pre-enrichment ซึ่งจะอำนวยให้ซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยหรือบาดเจ็บฟื้นตัวและเพิ่มปริมาณมากยิ่งขึ้น ทำให้โอกาสตรวจพบเชื้อมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 : เขย่า BPW ที่มีตัวอย่างแหนมในขั้นตอนที่ 3 ให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเหลวเพาะเชื้อ ซึ่งจะใช้อาหาร 2 ชนิด ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ

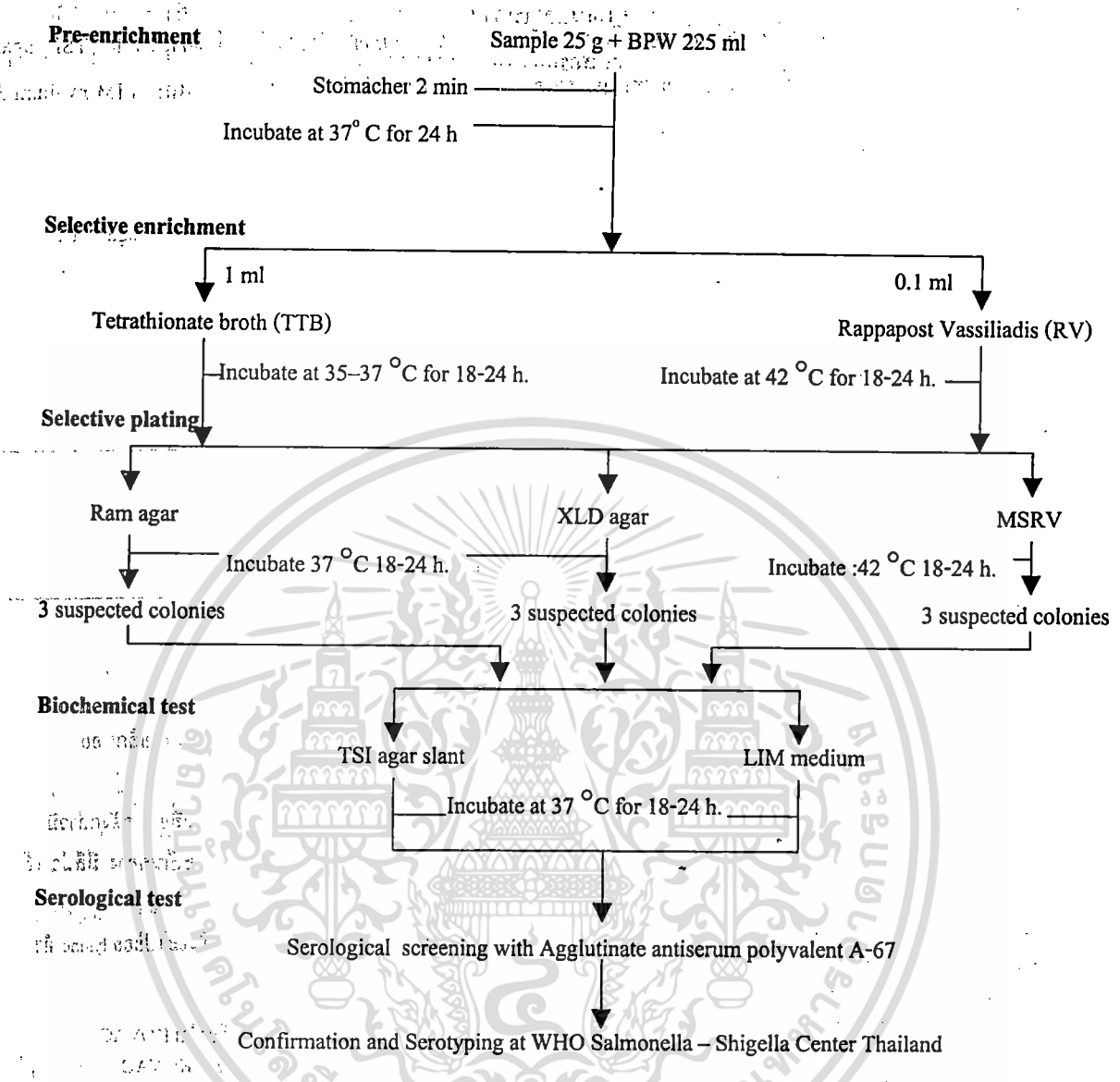
1. Tetrathionate broth (TTB) (10 มิลลิลิตร ซึ่งเติม Iodine solution 0.02 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียแกรมบวก) โดยถ่ายเชื้อจาก Pre-enrichment medium ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. Rappaport Vassiliadis (RV) (10 มิลลิลิตร) โดยถ่ายเชื้อจาก Pre-enrichment medium ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน Water bath อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอน Selective enrichment โดยที่ขั้นตอนดังกล่าวจะมีสารยับยั้งใน Selective enrichment ซึ่งจะช่วยในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียลำไส้และแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ซาลโมเนลลา แต่ซาลโมเนลลาที่แข็งแรงจากขั้นตอน pre-enrichment จะทนต่อสารยับยั้งต่าง ๆ เหล่านี้ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ขั้นตอนที่ 5 นำเชื้อในขั้นตอน Selective enrichment มาทำการเขี่ยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร XLD agar , MSRV medium และ HE agar เนื่องจากการใช้อาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อซาลโมเนลลาและเชื้อแบคทีเรียลำไส้อื่นๆได้ (Differential medium) โดยอาศัยหลักการของการหมักย่อยน้ำตาล เช่น น้ำตาลแลกโตส ซึ่งเชื้อซาลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ ยกเว้น *S.*Arizona ซึ่งจะหมักย่อยน้ำตาลได้บ้างหลังบ่มที่ 37 °ซ นานกว่า 24 ชั่วโมง แต่แบคทีเรียลำไส้ชนิดอื่นสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ภายใน 18-24 ชั่วโมง และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSRV อาศัยหลักการเคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลาของซาลโมเนลลาในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวภายใต้อุณหภูมิ 42 °C ซึ่งเชื้อซาลโมเนลลาที่แข็งแรงสามารถเจริญที่อุณหภูมิดังกล่าวได้และเคลื่อนที่ออกมาให้เห็นในขณะที่เชื้ออื่น ๆ ถูกยับยั้ง โดยการหยดเชื้อ 4 จุด ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์เชื้อซาลโมเนลลาโดยวิธี Standard Conventional method (USFDA, 1995; AOAC International ,1995)

<u>ขั้นตอนที่ 6</u> การทดสอบคุณสมบัติทางเคมี เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียลำไส้บางชนิดสามารถสร้างโคโลนีลักษณะคล้ายซาลโมเนลลามากในอาหาร อาจทำให้เลือกโคโลนีผิด ซึ่งในขั้นตอนนี้จะตรวจสอบเพื่อหาแนวโน้มที่จะพบเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่าง โดยโคโลนีของซาลโมเนลลาบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะ ดังนี้

- XLD agar ลักษณะโคโลนีของซาลโมเนลลาจะกลมใส มีหรือไม่มีจุดสีดำของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในโคโลนี
- HE agar ลักษณะโคโลนีจะมีสีดำเข้ม
- MSRV จะพิจารณาดูการเคลื่อนที่ของเชื้อจากจุดที่หยดเชื้อในขั้นตอนที่ 5 หยดเชื้อลงไป โดยที่เชื้อที่มีการสร้างแฟลกเจลลาจะเคลื่อนที่ไปรอบจุดที่หยดเชื้อ จะทำให้รอบจุดที่หยดเชื้อมีสีขาวขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในอาหารเพาะแยกเชื้อทั้งสามดังกล่าวถ่ายลงใน TSI agar และ LIM medium โดยสุ่มโคโลนีที่สงสัยมาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในหลอด TSI agar และ LIM medium 3 โคโลนีต่อหนึ่งอาหารเพาะแยกเชื้อ นำหลอดทั้งหมดบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 7 การทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางซีโรโลยี โดยนำชุดการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ TSI agar และ LIM medium ที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาตามคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลา

TSI agar				LIM medium		
slant	butt	H_2S	gas	lysine	indole	motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

K = alkaline ปลายหลอด (slant) ของ TSI จะมีสีแดง (ชมพูบานเย็น) A = acid ก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S + = ในหลอด TSI จะเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนใหญ่จะให้ผล +

H_2S - = ไม่มีตะกอนสีดำในหลอด TSI ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีไฮโดรเจนซัลไฟด์

gas + = มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและแกสเพียงเล็กน้อย

gas - = ไม่มีฟองอากาศให้เห็นในหลอด TSI ซึ่งมีบางเซโรวาร์ให้ผล –

lysine + = จะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อซาลโมเนลลามีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้น มีผลทำให้ brom cresol purple ซึ่งใช้เป็น indicator ในอาหารดังกล่าวและมีสีม่วงที่พีเอชเป็นกลาง มีสีม่วงเข้มมากยิ่งขึ้น ซึ่งซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีเอนไซม์ดังกล่าวนี้

lysine - = หลอดอาหารจะมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อที่ไม่มีเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่มีเอนไซม์ lysine deaminase ซึ่งจะไปย่อย lysine ทำให้พีเอชของอาหารต่ำลง มีผลทำให้สีม่วงของ brom cresol purple เปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง

indole + = จะมีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากหยดน้ำยา KOVAC

indole - = ไม่เกิดสีแดงหลังจากหยดน้ำยา KOVAC ซึ่งซาลโมเนลลาจะไม่มีเอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกริยากับ KOVAC

motile + = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM จะขุ่นทั้งหลอด ทั้งนี้เนื่องจากซาลโมเนลลาส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้น เมื่อทำการ stab เชื้อลงในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ LIM แล้วบ่มเพาะเชื้อซาลโมเนลลาจะเจริญเคลื่อนที่ออกจากรอย stab ไปทุกทิศทุกทาง จึงทำให้หลอดขุ่น

motile - = หลอดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีเชื้อเจริญบริเวณรอย stab เท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบรอย stab จะใส ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาใช้ในการเคลื่อนที่ จึงเจริญอยู่เฉพาะบริเวณรอย stab ซาลโมเนลลาที่ไม่มีแฟลกเจลลา ได้แก่ *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum

ทำการตรวจยืนยันว่าเชื้อที่ให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังกล่าวว่าเป็นซาลโมเนลลาหรือไม่ ด้วยการเขี่ยเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาบนผิววุ้นของหลอด TSI agar ที่ให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังกล่าว มาดูการตกการตกตะกอนกับหยด Agglutinating antiserum (polyvalent)A-67 ที่หยดเตรียมไว้บนสไลด์ที่สะอาด โดยใช้ loop ที่เขี่ยเชื้อจาก TSI agar เกลี่ยเชื้อให้ทั่วหยดของ antiserum บนสไลด์ สังเกตการตกตะกอนของเชื้อในหยด antiserum ถ้าเป็นเชื้อซาลโมเนลลาจะเกิดการตกตะกอนของเชื้อนั้น แต่ถ้าไม่ใช่เชื้อจะละลายอยู่ในหยดของ antiserum ขาวขุ่นเหมือนน้ำนมทั้งหยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 8 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อของหลอดเชื้อจาก TSI agar ในขั้นตอนที่ 7 ที่ให้ผลการตกตะกอนกับ Agglutinating antiserum (polyvalent)A-67 ลงในหลอด TSA ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำหลอดเชื้อ TSA ที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาทั้งหมดส่งตรวจวิเคราะห์ยืนยันเพื่อหาชนิดเซโรวาร์ของเชื้อซาลโมเนลลาที่ WHO Salmonella – Shigella center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.3.6 เปรียบเทียบหาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม

ศึกษาหาอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมในขั้นตอน Selective enrichment และอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อในขั้นตอน Selective plating ที่ให้ความถูกต้องแม่นยำ เหมาะสมที่สุดในการตรวจวิเคราะห์ โดยทำการพิจารณาจากปริมาณการตรวจพบและจำนวนเซโรวาร์ที่ตรวจพบ จากตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการทดลอง

3.3.7 ประเมินผลของพีเอชของแหนมต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา

ประเมินผลของพีเอชในตัวอย่างเทียบกับปริมาณตัวอย่างที่มีการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา รวมถึงชนิดเซโรวาร์ซาลโมเนลลาที่ตรวจพบในตัวอย่างแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกต่อการตรวจพบซาลโมเนลลาในแหนม

จากการสุ่มตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล 55 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment โดยใช้ Tetrathionate (TT) broth และ Rappaport-Vassiliadis (RV) medium กับขั้นตอน isolation โดยใช้ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar และ Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium ตามวิธีการมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อซาลโมเนลลาในอาหาร พบว่า ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมที่ทำการศึกษาถึง 28 ตัวอย่าง (50.9 %) (ตารางที่ 4.1) และจากการตรวจพบทั้งหมด 28 ตัวอย่างนี้ เป็นการตรวจพบจากการใช้ TT เป็น selective enrichment บ่มที่ 37° ซ จำนวน 23 ตัวอย่าง (41.8 %) และ จาก RV บ่มที่ 42° ซ จำนวน 22 ตัวอย่าง (40.0 %) ซึ่งพบว่าการใช้ TT หรือ RV ในขั้นตอน selective enrichment นั้น มีผลแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนม กล่าวคือ จำนวนตัวอย่างแหนมที่ตรวจพบจากการใช้ TT เป็น selective enrichment ให้ผลการตรวจพบมากกว่า RV เพียง 1 ตัวอย่าง แต่การใช้ทั้ง RV และ TT ในขั้นตอน selective enrichment ให้ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลามากกว่าการใช้ RV หรือ TT เพียงชนิดเดียวในขั้นตอน selective enrichment กล่าวคือ ตรวจพบจากตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองรวมกันมากขึ้นเป็น 28 ตัวอย่าง (50.9 %) โดยที่การตรวจพบซาลโมเนลลาจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองนั้นจะพบถึง 17 ตัวอย่าง ในขณะที่มี 6 ตัวอย่างตรวจพบเฉพาะในตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเชื้อใน TT และมี 5 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเฉพาะตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน RV (ไม่ได้นำเสนอข้อมูล) ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยในการตรวจพบซาลโมเนลลาในอาหารโดยทั่วไป ขึ้นกับชนิดและปริมาณของเชื้อเริ่มต้นที่มีในตัวอย่างอาหาร ปัจจัยของอาหารที่ทำการตรวจวิเคราะห์ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ สภาวะอากาศและอุณหภูมิของตัวอย่างที่อาจมีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์ซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนอยู่ และการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ที่มีในตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในขณะนั้นว่ามีมากหรือน้อยเพียงใด รวมถึงชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการยับยั้งเชื้ออื่น แต่เสริมการเจริญของซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนอยู่ให้มีมากพอที่จะทำการแยกเชื้อได้ในขั้นตอน selective plating (Frazier และ Westhoff, 1988; Hammack และคณะ, 1999) และจากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า การใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง RV ควบคู่ TT ในขั้นตอน selective enrichment ด้วยการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ สำหรับ TT และที่อุณหภูมิ 42° ซ สำหรับ RV ในการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม จะทำให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลาดีกว่าการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์

จากปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ และผลการตรวจพบซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนมดังได้กล่าวข้างต้น พอสรุปได้ว่าการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนมที่มีค่าพีเอชต่ำและมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูงในระดับที่แตกต่างกันในตัวอย่างแหนม (พีเอช ระหว่าง 4.17 – 5.20 และเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก ระหว่าง 1.34 – 2.39) ที่แสดงในตารางที่ 4.2 มีผลต่อการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่าง โดยที่แหนมที่มีค่าพีเอชต่ำมากและมีปริมาณกรดแลกติกสูงจะมีปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซาลโมเนลลามากกว่าแหนมที่มีค่าพีเอชสูงกว่าและมีปริมาณกรดแลกติกที่ต่ำ กล่าวคือตัวอย่างแหนมที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 และมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูงกว่า 1.74 จะตรวจไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา แต่ตัวอย่างแหนมที่ตรวจพบซาลโมเนลลาโดยมากมีค่าพีเอชสูงกว่า 4.5 ทั้งสิ้น และมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกอยู่ในช่วงที่น้อยกว่าตัวอย่างแหนมที่ไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในหมูเนื้อสันโดยวิธีมาตรฐานจากขั้นตอน selective enrichment

จำนวนตัวอย่าง (%)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบซาลโมเนลลาจาก		จำนวนทั้งหมดที่ตรวจพบซาลโมเนลลา (%)
	TT (%)	RV (%)	
55 (100.0)	23 (41.8)	22 (40.0)	28 (50.9)

ตารางที่ 4.2 ค่าพีเอชของแหนมในช่วงต่าง ๆ ต่อการตรวจพบและไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา

	ช่วงพีเอชที่ตรวจ พบ/ไม่พบ ซาลโมเนลลา			จำนวนตัวอย่าง[n] ทั้งหมด	ช่วงพีเอช[w]	ช่วงเปอร์เซ็นต์[n] กรดแลกติก
	น้อยกว่า 4.5	4.5 – 5.0	มากกว่า 5.0			
จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบซาลโมเนลลา	0	24	4	28	4.54 – 5.20	1.34 – 1.74
จำนวนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบซาลโมเนลลา	10	16	1	27	4.17 – 5.04	1.45 – 2.39

[n] จำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษารวม 55 ตัวอย่าง

[w] ช่วงพีเอชแหนมที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 4.17 – 5.20

[n] ช่วงเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกแหนมที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 1.34 – 2.39

4.2 เปรียบเทียบผลของอาหารเพาะเชื้อในขั้นตอน selective enrichmentต่อชนิดและปริมาณของซาลโมเนลลาที่ตรวจพบในตัวอย่างแหนม

จากตัวอย่างแหนมที่ตรวจพบซาลโมเนลลาทั้งหมด 28 ตัวอย่างนั้น เป็นเชื้อที่ได้รับการตรวจยืนยันเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาจาก WHO *Salmonella-Shigella* center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 40 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 40 สายพันธุ์นี้ เมื่อนำมาแยกชนิดเซโรวาร์เทียบกับจำนวนตัวอย่างที่พบในแต่ละเซโรวาร์ (ตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่ 4.3) พบว่า มีเชื้อซาลโมเนลลาปนเปื้อนในแหนมที่ทำการศึกษามากถึง 14 เซโรวาร์ โดยที่ *S.* Anatum เป็นเซโรวาร์ที่มีการตรวจพบมากที่สุด คือ ตรวจพบถึง 13 ตัวอย่าง คิดเป็น 32.5 % ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่ส่งตรวจวิเคราะห์ รองลงมาได้แก่ *S.* Rissen ที่ตรวจพบ 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 15.0 % ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้รับการตรวจยืนยัน ซึ่งทั้งสองเซโรวาร์นี้ สัมพันธ์กับเซโรวาร์ที่ตรวจพบมากที่สุดสองอันดับต้นในตัวอย่างหมูสดที่จำหน่ายตามตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ดังรายงานของ อดิศร และคณะ (2547)

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่ตรวจพบในหมูเนื้อสันจำนวน 44 ตัวอย่างจากขั้นตอน selective enrichment

เซโรวาร์	จำนวนตัวอย่างที่พบจาก		จำนวนตัวอย่างที่พบทั้ง
	TT (%)	RV (%)	จาก TT และ RV (%)
1. Anatum	9 (22.5)	11 (27.5)	13 (32.5)
2. Rissen	4 (10.0)	5 (12.5)	6 (15.0)
3. Stanley	3 (7.5)	2 (5.0)	4 (10.0)
4. Agona	3 (7.5)	0 (0.0)	3 (7.5)
5. Schwarzengrund	3 (7.5)	2 (5.0)	3 (7.5)
6. Orion	1 (2.5)	2 (5.0)	2 (5.0)
7. Panama	0 (0.0)	2 (5.0)	2 (5.0)
8. Amsterdam	0 (0.0)	1 (2.5)	1 (2.5)
9. Give	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)
10. Hvittingfoss	1 (2.5)	1 (1.0)	2 (2.1)
11. I.4,5,12:I:-	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (2.5)
12. Krefeld	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (2.5)
13. Typhimurium	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (2.5)
14. Weltevreden	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (2.5)
รวมเซโรวาร์ที่พบทั้งหมด	11 เซโรวาร์ (78.6)	9 เซโรวาร์ (64.3)	14 เซโรวาร์ (100.0)
รวมเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด	28 เชื้อ (70.0)	27 เชื้อ (67.5)	40 เชื้อ (100.0)

เป็นที่น่าสังเกตว่า จากการตรวจหาซาลโมเนลลาด้วยการใช้ RV เป็น selective enrichment เพียงอย่างเดียว นอกจากจะให้จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบน้อยกว่า TT 1 ตัวอย่างอย่างดังแสดงในตารางที่ 1 แล้ว ในตารางที่ 4.3 RV ยังให้ผลปริมาณเชื้อที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นซาลโมเนลลา 27 สายพันธุ์ (67.5 %) ซึ่งน้อยกว่า TT ที่มีการยืนยันว่าตรวจพบซาลโมเนลลามากกว่า คือ ได้รับการยืนยันว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลา 28 สายพันธุ์ (70.0 %) และเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่ได้ใน TT ตรวจพบได้สูงกว่าใน RV อีกด้วย กล่าวคือ พบเซโรวาร์มากถึง 11 เซโรวาร์ (78.6 %) โดยมี 4 เซโรวาร์ ที่ตรวจพบเฉพาะในอาหารที่ผ่านการ selective enrichment ใน TT คือ I.4,5,12:I:-, Krefeld, Typhimurium และ Weltevreden ในขณะที่ RV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับการยืนยันว่าเป็นซาลโมเนลลาเพียง 9 เซโรวาร์ (64.3 %) และมีเพียง 2 เซโรวาร์เท่านั้นที่ตรวจพบเฉพาะในอาหารที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน RV คือ Panama และ Amsterdam ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องจากว่า เชื้อซาลโมเนลลาที่ตรวจพบในตัวอย่างแหนมที่นำมาตรวจวิเคราะห์นี้ มาจากหลายแหล่งในเขตกรุงเทพและปริมณฑล ซึ่งแต่ละแหล่งอาจมีระดับการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแตกต่างกัน รวมถึงมีระดับความเป็นกรดและพีเอชที่แตกต่างกัน มีผลทำให้เชื้อซาลโมเนลลาที่อาจอยู่ในรูปของเซลบาดเจ็บในลักษณะที่เรียกว่า acid injured cells มากน้อยแตกต่างกัน เมื่อนำตัวอย่างแหนมมาทำการเพาะเลี้ยงในขั้นตอน preenrichment จะทำให้ทั้งชนิดเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาและปริมาณเซลที่ฟื้นตัวแข็งแรงจากขั้นตอน preenrichment มีปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อทำการถ่ายเพาะเชื้อลงในขั้นตอน selective enrichment ปริมาณการถ่ายเชื้อตามคำแนะนำของวิธีมาตรฐาน ได้แนะนำให้ถ่ายเชื้อจากขั้นตอน preenrichment ลงสู่ขั้นตอน selective enrichment ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองในระดับที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ให้ทำการถ่ายเชื้อหลัง preenrichment ลงใน TT ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ในขณะที่การถ่ายเชื้อลงสู่ RV ใช้เพียง 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณการถ่ายตัวอย่างหลัง preenrichment ที่ต่างกันถึง 10 เท่า นี้ อาจมีผลทำให้เกิดความแตกต่างของเซโรวาร์ที่เจริญในขั้นตอน selective enrichment และส่งผลถึงการเก็บเชื้อในขั้นตอน selective plating อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนมตามวิธีมาตรฐานของ BAM และ AOAC โดยใช้อุณหภูมิการบ่มของ TT ที่ 37° ซ ควบคู่กับ RV ที่ 42° ซ ในขั้นตอน selective enrichment นอกจากจะให้จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อมากกว่าการใช้อาหาร TT หรือ RV เพียงชนิดเดียวแล้ว และยังพบว่าผลรวมการตรวจพบเซโรวาร์ของซาลโมเนลลามากขึ้นกว่าการใช้อาหารในขั้นตอนดังกล่าวเพียงชนิดเดียวด้วย

4.3 เปรียบเทียบอาหารเพาะแยกเชื้อในขั้นตอน selective plating ต่อการตรวจพบชนิดและปริมาณของเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนม

จากการเปรียบเทียบอาหารเพาะแยกเชื้อในขั้นตอน selective plating โดยใช้อาหารแข็ง HE, XLD agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ และ อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว MSRV บ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ (ตารางที่ 4.4) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC พบว่า ไม่ว่าจะเป็นการแยกเชื้อโดยผ่านขั้นตอน selective enrichment ด้วย TT หรือ RV การแยกเชื้อโดยใช้ MSRV จะให้ผลในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูงกว่าการแยกเชื้อในอาหารแข็ง XLD และ HE ตามลำดับ โดยที่ MSRV ให้การตรวจพบซาลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (92.9 %) ในขณะที่ XLD ตรวจพบ 18 ตัวอย่าง (64.3%) และ HE พบเพียง 13 ตัวอย่าง (46.4 %) ซึ่งการแยกเชื้อจากตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน selective enrichment ด้วย TT จะให้ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูงกว่า RV ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MSRV และยังพบว่าเชื้อที่เจริญใน MSRV ที่ผ่าน selective enrichment ด้วย TT ให้การตรวจพบชนิดเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาสูงกว่าที่ตรวจพบใน RV รวมถึง ในอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อ XLD และ HE ด้วย แต่ RV จะให้ผลการตรวจพบทั้งชนิดเซโรวาร์และปริมาณตัวอย่างที่พบในอาหารแข็งเพาะแยกเชื้อ XLD และ HE มากกว่าการใช้ TT เป็น selective enrichment

เหตุผลหนึ่งที่ทำให้ตัวอย่างที่ผ่านการ selective enrichment ด้วย TT ที่อุณหภูมิ 37° ซ แล้วนำมาเขี่ยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง HE และ XLD ให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลาทั้งจำนวนตัวอย่างและชนิดเซโรวาร์น้อยกว่า MSRV อาจเป็นเพราะว่า การเพาะเชื้อซาลโมเนลลาในขั้นตอน selective enrichment ใน TT ที่อุณหภูมิ 37° ซ นั้น อุณหภูมิดังกล่าว ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียลำไส้อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างแหนม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อในกลุ่มที่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตส (lactose fermenting bacteria)ได้ เช่น Coliforms, *E. coli* เป็นต้น รวมถึงเชื้อในกลุ่มที่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลกโตสที่ไม่ใช่ซาลโมเนลลาอื่น เช่น *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. เป็นต้น ทำให้เชื้อกลุ่มดังกล่าวเจริญขึ้นมาบดบังเชื้อในกลุ่มซาลโมเนลลา โดยที่โคโลนีของเชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลกโตสจะมีสีต่างจากซาลโมเนลลา ซึ่งไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตส โดยที่เชื้อที่หมักย่อยน้ำตาลแลกโตสจะมีโคโลนีสีเหลืองบน XLD และมีสีชมพูบน HE (ภาพที่ 2 – ค และ จ) ส่วนเชื้อซาลโมเนลลาและเชื้อในกลุ่มอื่นที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลกโตสจะมีโคโลนีใส และมีหรือไม่มีจุดสีดำของไฮโดนเจนซัลไฟด์กลางโคโลนี ทำให้การสุ่มตรวจเชื้อ ถึงแม้ว่าจะทำการสุ่มตรวจมากถึง 3 โคโลนีต่อตัวอย่างนั้น ผิดพลาดได้ แต่ใน RV นั้น เนื่องจากเป็นการบ่มที่อุณหภูมิที่สูงและเหมาะสมต่อซาลโมเนลลาที่แข็งแรงจากขั้นตอน preenrichment ซึ่งอุณหภูมิ 42° ซ นี้ จะเสริมการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาส่วนใหญ่ที่แข็งแรง แต่ช่วยลดการเจริญของเชื้อคู่แข่งอื่น จึงเห็นว่ามีเชื้อที่น่าจะเป็นซาลโมเนลลาบนอาหาร XLD และ HE มากกว่าใน TT ที่บ่ม 37° ซ (ภาพที่ 2 – ง และ ฉ)

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาและชนิดเซโรวาร์ที่พบจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน isolation หลังจากบ่มเพาะเชื้อด้วย TT และ RV

	จำนวนตัวอย่างที่พบ (%)[ก]	จำนวนตัวอย่างที่พบจาก TT และ RV (%)[ก]	จำนวนเซโรวาร์ที่พบ (%)[ข]	จำนวนเซโรวาร์ที่พบจาก TT และ RV (%)[ข]
TT→MSRV	21 (75.0)	26	22 (55.0)	27
RV→MSRV	18 (64.3)	(92.9)	19 (47.5.)	(67.5)
TT→XLD	11 (39.3)	18	13 (32.5)	24
RV→XLD	15 (53.6)	(64.3)	15 (37.5)	(60.0)
TT→HE	6 (21.4)	13	6 (15.0)	14
RV→HE	9 (32.1)	(46.4)	9 (22.5)	(35.0)

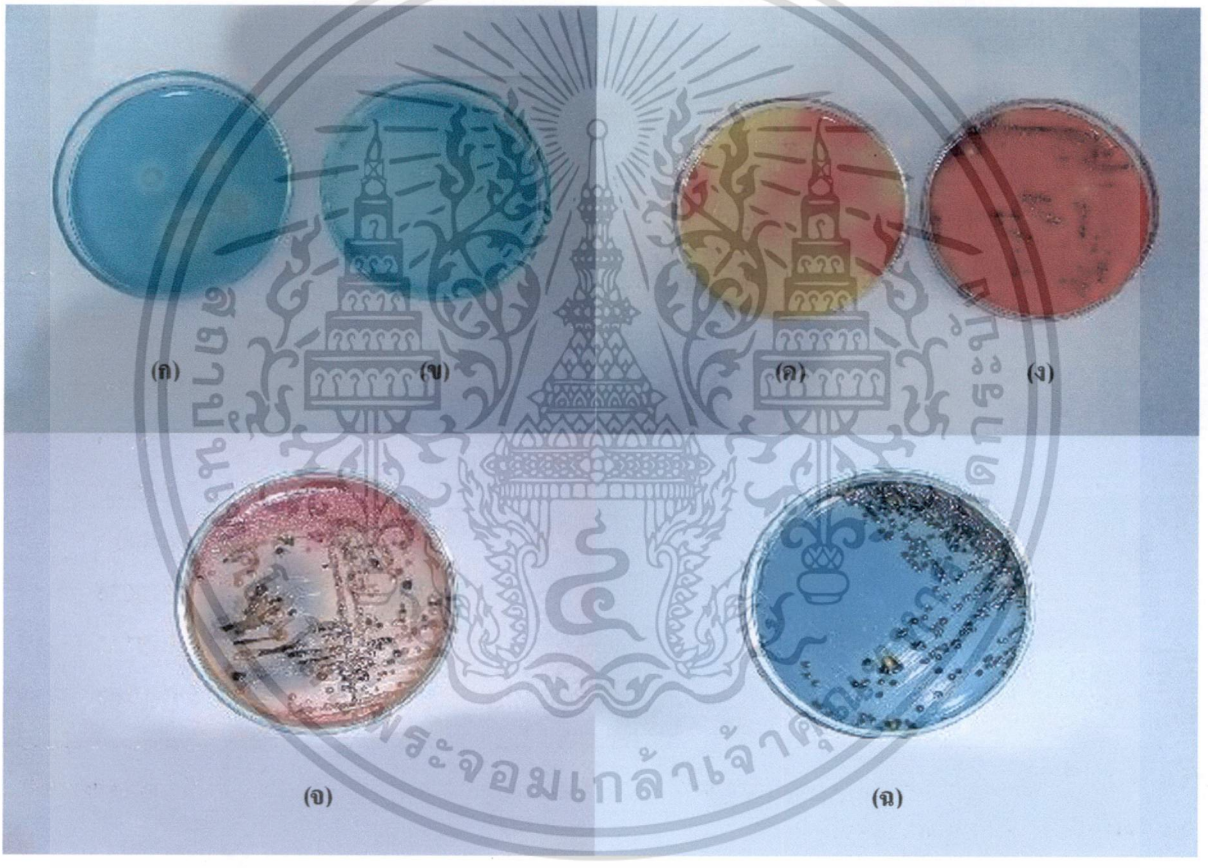
ก – เป็นค่าเปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างที่พบซาลโมเนลลาทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

ข – เป็นค่าเปอร์เซ็นต์จากเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่ได้รับการตรวจยืนยันผลจากทาง WHO Salmonella-Shigella center ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ จากตัวอย่างที่พบซาลโมเนลลาทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

สำหรับ MSRV นั้น เป็นอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid medium) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ โคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในอาหารเพาะเชื้อนี้ อาศัยหลักการที่ว่า ที่อุณหภูมิดังกล่าว อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment ที่มีเชื้อซาลโมเนลลาที่แข็งแรง เชื้อซาลโมเนลลาในกลุ่มที่สร้างแฟลกเจลลาได้จะสร้างแฟลกเจลลาได้ดีที่อุณหภูมิดังกล่าว ทำให้เชื้อสามารถเจริญเคลื่อนที่ไปรอบ ๆ จุดที่หยดอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งอุณหภูมิที่สูงนี้จะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคลำไส้อื่นที่จะเจริญแข่งได้ดี (ภาพที่ 2 – ก และ ข) แต่สาเหตุที่ปริมาณเซ-โรวาร์ที่ตรวจพบมากจากการใช้ TT เป็นอาหารในขั้นตอน selective enrichment นั้น เป็นไปได้ที่ว่า เนื่องจากเชื้อในกลุ่มซาลโมเนลลานี้มีมากกว่า 2,500 เซโรวาร์ในปัจจุบัน และการปนเปื้อนของแต่ละเซโรวาร์ที่พบในตัวอย่างแหนมที่นำมาตรวจวิเคราะห์อาจมีการปนเปื้อนมากน้อยแตกต่างกัน ดังนั้น การบ่มเพาะเชื้อในขั้นตอน selective enrichment หลังจากพรีเอนริชให้เชื้อแข็งแรงแล้ว เชื้อซาลโมเนลลาเซโรวาร์ที่มีปริมาณน้อย และอาจเจริญได้ไม่ดีในอาหาร RV ที่อุณหภูมิ 42° ซ ไม่สามารถเจริญขึ้นให้เห็นโคดเด่นใน MSRV ที่บ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ แต่ในอาหาร TT ที่อุณหภูมิ 37° ซ เชื้อซาลโมเนลลาที่มีปริมาณน้อยที่ผ่านขั้นตอนการพรีเอนริชจะมีโอกาสเจริญขึ้นได้อีกจนจำนวนมากพอและเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อใน MSRV และบ่มที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้โอกาสของเชื้อซาลโมเนลลาหลายเซโรวาร์ในอาหาร TT แสดงออกมาโคดเด่นขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้



ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อซาลโมเนลลาและเชื้อแบคทีเรียลำไส้อื่นที่เจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อซาลโมเนลลาในขั้นตอน selective plating ที่เขี่ยเชื้อจาก TT ที่บ่มในอุณหภูมิ 37° ซ และ จาก RV ที่บ่มในอุณหภูมิ 42° ซ

(ก) MSRV ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณน้อยจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก TT

(ข) MSRV ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณมากจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก RV

(ค) XLD ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณน้อยจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก TT

(ง) XLD ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณมากจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก RV

(จ) HE ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณน้อยจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก TT

(ฉ) HE ที่พบเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซาลโมเนลลาในปริมาณมากจากการเขี่ยเพาะเชื้อจาก RV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบความไวในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาและจำนวนเซโรวาร์ที่พบจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน isolation หลังจากบ่มเพาะเชื้อด้วย TT และ RV

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ	จำนวนตัวอย่าง		ความไวในการตรวจสอบ	จำนวนเซโรวาร์ที่พบ [ก]
	พบซาลโมเนลลา	ไม่พบซาลโมเนลลา	(%)	(%)
TT⟶				
MSRV	21	7	75.0	10 (71.4)
XLD	11	17	39.3	6 (42.9)
HE	6	22	21.4	3 (21.4)
MSRV + XLD	21	7	75.0	11 (78.6)
MSRV + HE	23	5	82.1	10 (71.4)
XLD + HE	15	13	53.6	7 (50.0)
MSRV + XLD + HE	23	5	82.1	11 (78.6)
RV⟶				
MSRV	18	10	64.3	7 (50.0)
XLD	15	13	53.6	7 (50.0)
HE	9	19	32.1	7 (50.0)
MSRV + XLD	22	6	78.6	9 (64.3)
MSRV + HE	18	10	64.3	9 (64.3)
XLD + HE	15	13	53.6	8 (57.1)
MSRV + XLD + HE	22	6	78.6	9 (64.3)

ก – เป็นค่าเปอร์เซ็นต์จากเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่ได้รับการตรวจยืนยันผลจากทาง WHO Salmonella-Shigella center ทั้งหมด 14 เซโรวาร์ จากตัวอย่างที่พบซาลโมเนลลาทั้งหมด 28 ตัวอย่าง

แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนมตามวิธีของ AOAC ด้วยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment อย่างน้อย 2 ชนิด เช่น TT ที่บ่มในอุณหภูมิ 37° ซ และ RV ที่บ่มในอุณหภูมิ 42° ซ แล้วนำมาเพาะแยกเชื้อโดยใช้อาหารในขั้นตอน selective plating ถึงแม้ว่า MSRV จะให้ผลความไวในการตรวจเชื้อซาลโมเนลลาได้มากกว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ HE และ XLD โดยมีเปอร์เซ็นต์ความไวการตรวจพบเชื้อหลังจากบ่มเพาะเชื้อใน TT และ RV เท่ากับ 75.0 และ 64.3 ตามลำดับ รวมถึงได้ชนิดเซโรวาร์ที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น 71.4 และ 50.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) แต่ว่าการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective plating มากกว่า 1 ชนิด จะให้ผลการตรวจพบซาลโมเนลลาคิดเป็นจำนวนตัวอย่างที่สูงกว่าใช้อาหารชนิดเดียว รวมถึงเปอร์เซ็นต์ความไวและจำนวนเซโรวาร์ที่เพิ่มมากขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษานี้พบว่า การตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาจากตัวอย่างแหนมพร้อมบริโภคที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑลจำนวน 55 ตัวอย่าง ตามวิธีมาตรฐานของการตรวจหาซาลโมเนลลาในอาหารของ BAM หรือ AOAC พบว่า ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลารวมทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง โดยที่ตัวอย่างแหนมที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 4.5 คือในช่วง 4.54 – 5.20 และมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกในช่วง 1.34 – 1.74 จะมีโอกาสตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูง ในขณะตัวอย่างแหนมที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 4.5 และมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูงกว่า 1.74 จะตรวจไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา จากการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ selective plating ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาจากตัวอย่างดังกล่าว พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment ด้วยอาหาร TT บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ ให้ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลามากกว่า การใช้ RV บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 42° ซ นอกจากนี้ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TT ยังพบชนิดของเซโรวาร์ที่มากกว่า RV ซึ่งจากการศึกษานี้พบเชื้อซาลโมเนลลาโดยรวมมากถึง 14 เซโรวาร์ โดยที่ *S.* Anatum เป็นเซโรวาร์ที่มีการตรวจพบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *S.* Rissen และ *S.* Stanley ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective plating 3 ชนิด ได้แก่ MSRV, XLD และ HE พบว่า MSRV เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective plating ที่เหมาะสมที่สุดต่อการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในตัวอย่างแหนม โดยให้ความไวในการตรวจพบเชื้อสูง รวมถึงปริมาณเซโรวาร์ที่สูงจากตัวอย่างที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อในขั้นตอน selective enrichment ทั้งใน TT และ RV แต่อย่างไรก็ตาม การใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ selective plating ตั้งแต่ 2 ชนิด ให้ผลความไวในการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาจากตัวอย่างอาหารดังกล่าว รวมถึงปริมาณเซโรวาร์ของซาลโมเนลลาที่สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ควงคาว วงศ์สมมาตร, นงคราญ เรืองประพันธ์, จุรีภรณ์ บุญวงศ์วิโรจน์, น้อย ทองสกุลพานิชย์ และ จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2537. พยาธิและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแหนม. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 36(3) : 167-171.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2518. การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการระหว่างการทำแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุขใจ โสมะฐิติ. 2525. การสำรวจเชื้อโรคลำไส้บางชนิดในแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแหนม (ในหลอดทดลอง). อาหาร : 107-115.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ นภา โล่ห์ทอง. 2534. อาหารเพาะเชื้อสำหรับพรีเอนริชซาลโมเนลลาในแหนมและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเพาะเชื้อ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 33(1) : 1-12.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่าตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ salmosyst และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม. *ใน* : การประชุมวิชาการครั้งที่ 34 สาขา สัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 272-279.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัฒน์, ปรีชา จึงสมานุกูล และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2538. ซาลโมเนลลาในอาหารพร้อมบริโภค. วารสารเทคนิคการแพทย์. 23(2) : 153-160.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, วราวุฒิ ครูส่ง, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2547. เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก. อยู่ในระหว่างการตรวจแก้ไขเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารเกษตรพระจอมเกล้า ฉบับที่ 2 ปีพ.ศ. 2547.

AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed., 967.25, 967.26, 967.28, and 995.20. AOAC International, Gaithersburg, Md.

Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Grijspeerdt, K., and Herman, L. 2003. *Salmonella* on Pig Carcasses: Positive Pigs and Cross Contamination in the Slaughterhouse. J. of Appl. Microbiol. 95 : 891-903.

Dababneh, B.F.A. and Al-Delaimy, K.S. 1984. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Garlic Extract. Lebensm.-Wiss. U. Technol. 17 : 29-31.

Hammack, T.S., Amaguana, R.M., June, G.A., Sherrod, P.S., and Andrews, W.H. 1999. Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* from Foods with a Low Microbial Load. J. of Food Prot. 62(1) : 16-21.

Hammes, W.P., and Knauf, H.J. 1994. Starters in the Processing of Meat Products. Meat Sci. 36, 155-168.

Jay, J.M. 1992. Modern Food Microbiology. 4th ed.Van Nostrand Reinhold Co. Inc., New York.

June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguana, R.M., and Andrews, W.H. 1995. Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* from Raw Flesh and Other Highly Contaminated Foods : Precollaborative Study. J. AOAC Int. 78 : 375-380.June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguana, R.M., and Andrews, W.H. 1996. Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* from Raw Flesh and Highly Contaminated Foods : Precollaborative Study. J. AOAC Int. 79 : 1307-1323.

Lotong, N., Sunthornandh, P., Daengsubha, W., and Utarapichat, O. 1987. Microbiology Quality and Safety of the Traditional Fermented Pork II : Selection of Salmonella-inhibiting Lactic Acid Bacteria for Nham Fermentation. Annual Report, Thailand-Asean Food Technology and Research Development Project.

Lotong, N., and Swetwiwathana, A. 1990. Production of Salmonella Free Nham. Annual Report, ASEAN Food Technology and Research Development Project.

O'Donoghue, D., and Winn, E. 1993. Comparison of the MSRV Method with an in Hours Conventional Method for the Detection of Salmonella in Various High and Low Moisture Foods. Lett. Appl. Microbiol. 17 : 174-177.

Patil, M.D., and Parhad, N.M. 1986. Growth of Salmonellas in Different Enrichment Media. J. of Appl. Bacteriol. 61 : 19 – 24.

Popoff M.Y., Bockemuehl, J., Brenner, F.W., and Gheesling, L.L. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White Scheme. Res Microbiol. 152 : 907-909.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rose, B.E., Hill, W.E., Umholtz, R., Ransom, G.M., and James, W.O. 2002. Testing for *Salmonella* in Raw Meat and Poultry Products Collected at Federally Inspected Establishments in the United States, 1998 through 2000. J. of Food Prot. 65(1), 937 - 947.

Smedt, J.M. 1998. AOAC validation of Qualitative and Quantitative Methods for Microbiology in Foods. Inter. J. of Food Microbiol. 45 : 25-28.

Swanenburg, M., Urlings, H.A.P., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D.A., and Van Knapen, F. 2001. *Salmonella* in Slaughter Pigs : Prevalence, Serotypes and Critical Control Points during Slaughter in Two Slaughterhouses. Int. J. Food Micro. 70, 245 – 256.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., and Fischer, A. 1999 a. Role of Garlic on Growth and Lactic Acid Production of Starter Cultures. International Fleischwirtschaft. 1 : 26-29.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., and Fischer, A. 1999 b. Controlling the Growth of *Salmonella anatum* in Nham : Effect of Meat Starter Cultures, Nitrate, Nitrite and Garlic. Fleischwirtschaft. 79(9) : 124-128.

Thatcher, F.S., and Clark, D.S. 1968. Microorganisms in Foods : Their Significance and Methods of Enumeration. University of Toronto Press, Toronto, Ontario. 560 p.

Thorberg, B.M., and Engvall, A. 2001. Incidence of *Salmonella* in Five Swedish Slaughterhouse. J. of Food Prot. 64(4), 542 - 545.

USFDA (U.S. Food and Drug Administration). 1995. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้