การดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์หา *Clostridium perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

SELECTIVE CULTURE MEDIUM MODIFICATION FOR PRESUMPTIVE *Clostridium perfringens* DETECTION IN DRINKING WATER AND ICE

พรรณชรินทร์ ศรัทธา

PUNCHARIN SATTHA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AI-M-054-059

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์หา *Clostridium perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

SELECTIVE CULTURE MEDIUM MODIFICATION FOR PRESUMPTIVE *Clostridium perfringens* DETECTION IN DRINKING WATER AND ICE

T105477

พรรณชรินทร์ ศรัทธา

PUNCHARIN SATTHA

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 105477
วัน,เดือน,ปี..... 24 พ.ย. 2552

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL -2009-AI-M-054-059

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SELECTIVE CULTURE MEDIUM MODIFICATION FOR PRESUMPTIVE *Clostridium perfringens* DETECTION IN DRINKING WATER AND ICE

PUNCHARIN SATTHA

A THESIS SUBMITTED IN PARTLY FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-AI-M-054-059

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์หา *Clostridium perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

Selective Culture Medium Modification for *Clostridium perfringens* Detection in Drinking Water and Ice

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรรณชรินทร์ ศรัทธา

รหัสประจำตัว 48068759

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง	
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
นายปรีชา จึงสมานกุล	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 19 ตุลาคม 2552 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์)

รักษาการแทนคณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 27 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 2552

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
วันที่ 30 เดือน ๓-๑- พ.ศ. 52
ลงชื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์หา *Clostridium perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง
นักศึกษา	นางสาวพรรณชรินทร์ ศรัทธา
รหัสประจำตัว	48068759
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การพัฒนาอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง ซึ่งดัดแปลงจาก Tryptose-sulfite-cycloserine agar ด้วยการเติม L-Cysteine hydrochloride, Sodium thioglycolate ซึ่งเป็นสารก่อสภาวะรีดิวซ์ เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของ *C. perfringens* โดยไม่ต้องทำการบ่มในโถควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน และใช้ซองดูดซับออกซิเจน และทำการคัดแปลงใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของวิธีที่คัดแปลงขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ ISO 7937 (2004) ในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อน *C. perfringens* 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1-9 cfu/1 ml 10-99 cfu/ 1 ml และ 100-999 cfu/ 1ml วิธีวิเคราะห์ที่คัดแปลงขึ้นสามารถวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็งได้เทียบเท่ากับวิธีการวิเคราะห์ของ ISO 7937 (2004) โดยมีช่วงการปนเปื้อนต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้อง คือ >1 cfu/ml ถึง <5 cfu/ml จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของวิธีที่คัดแปลงขึ้นโดยใช้วิธีการกรอง เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ Environment agency (2004) ในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อน *C. perfringens* 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1-9 cfu/100 ml 10-99 cfu/ 100 ml และ 100-999 cfu/100 ml วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 100 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการกรอง การปรับอาหารคัดแยกเชื้อที่คัดแปลงขึ้นให้เข้มข้นเป็น 4 เท่า และทำการวิเคราะห์ควบคู่กับการวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า วิธีการที่คัดแปลงขึ้นโดยใช้ Modified TSC medium เข้มข้น 4 เท่า มีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ได้จริงในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Selective Culture Medium Modification for Presumptive *Clostridium perfringens* Detection in Drinking Water and Ice.
Student	Miss Puncharin Sattha
Student ID.	48068763
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2009
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adison Swetwiwatahana

ABSTRACT

This study is to improve the detection technique of *C. perfringens* in drinking water and ice by the addition of the reducing agents, L-Cysteine hydrochloride and Sodium thioglycolate into Tryptose-sulfite-cycloserine agar (TSC). This allows the modified media to be an anaerobic condition without using the anaerobic jar. ISO 7937 (2004) were used to validate the method. The concentrations of *C. perfringens* used in this study were 1-9 cfu/1 ml, 10-99 cfu/1 ml and 100-999 cfu/1 ml. The results revealed that the modified method has a potential for the detection of *C. perfringens* in drinking water and ice. When compared to the analysis method of ISO 7937, relative detection level of this modified method was >1 to <5 cfu/1 ml. To validate this modified method with the analysis method for drinking water from Environment agency (2004) for 3 levels of *C. perfringens* contamination (1-9 cfu/100 ml, 10-99 cfu/100 ml and 100-999 cfu/100 ml), the results indicated that the modified method has not a potential for the detection of *C. perfringens* in drinking water and ice by using membrane filtration technique of 100 ml sample. When adjusted the modified medium to quadruple strength in 25 ml for *C. perfringens* detection of 100 ml of drinking water or ice and compared to the analysis method of drinking water and ice from Department of Medical Science, the results showed that this quadruple strength of modified TSC medium could be used as presumptive method for *C. perfringens* detection in drinking water and ice.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาจาก รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้ารู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง คุณปรีชา จึงสมานกุล และ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ คณะกรรมการสอบ สำหรับคำแนะนำต่างๆ

ขอกราบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอกราบพระคุณพี่ๆ น้องๆ ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลนีแห่งประเทศไทย และกองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ได้สนับสนุนเครื่องมือตลอดจนข้อมูล และหนังสือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พรรณชรินทร์ ศรัทธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญรูป.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... .2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 สัณฐานของ *C. perfringens* 4

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *C. perfringens* 11

2.3 การอยู่รอดหรือทนทานสภาวะไม่เหมาะสมของ*C. perfringens*.....13

2.4 การวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกเชื้อ.....17

2.5 การวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยชุดทดสอบ..... 19

2.6 สมบัติของโถควบคุมสภาวะ และซองคูคซับออกซิเจน.....19

2.7 สมบัติของ Tryptose sulfite cyccloserine (TSC) agar หรือ SFP agar..... 20

2.8 สมบัติของ D-Cycloserine 20

2.9 สมบัติของ Sodium thioglycolate.....21

2.10 สมบัติของ L-Cysteine.....21

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....23

3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....23

3.2 สถานที่ทำการทดลอง.....25

3.3 วิธีการดำเนินการ.....25

3.4 การแปลผลการวิเคราะห์และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....31

4.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ Modified TSC medium.....31

4.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง.....32

4.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง.....40

4.4 ศึกษาการใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่พัฒนาขึ้นแบบเข้มข้นในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐานในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ.....47

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....50

บรรณานุกรม.....52

ภาคผนวก.....55

ประวัติผู้เขียน.....104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สารพิษที่ผลิตโดย *C. perfringens* ชนิด (type) ต่างๆ.....7

2.2 ตัวอย่างสายพันธุ์ *C. perfringens* ที่มี *cpe* gene อยู่บนโครโมโซม *cpe* gene.....9
บนพลาสมิด และไม่มี *cpe* gene บนพลาสมิด

2.3 ความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ของ *C. perfringens*.....15

2.4 ความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ของ *C. perfringens*.....16

2.5 ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ *C. perfringens* ที่มีจำหน่ายเป็นการค้า.....19

4.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ.....31
Modified TSC medium

4.2 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar 33
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

4.3 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 35
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำดื่มต่อ 1 มิลลิลิตร

4.4 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 36
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 1 วัน
ต่อ 1 มิลลิลิตร

4.5 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 37
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 4 วัน
ต่อ 1 มิลลิลิตร

4.6 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 38
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 7 วัน
ต่อ 1 มิลลิลิตร

4.7 ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการทดสอบของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 39
กับวิธีที่ดัดแปลงขึ้น

4.8 ความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น.....39
เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีเทียบกับ ISO 7937:2004

4.9 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Environment agency (2004) 40
ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.10 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ Environment agency (2004) 42
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำดื่มต่อ 100 มิลลิลิตร

4.11 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ วิธีของ Environment agency (2004).....43
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 1 วัน
ต่อ 100 มิลลิลิตร

4.12 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ วิธีของ Environment agency (2004).....44
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 4 วัน
ต่อ 100 มิลลิลิตร

4.13 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ วิธีของ Environment agency (2004)..... 45
ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 7 วัน
ต่อ 100 มิลลิลิตร

4.14 ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีทดสอบของ Environment agency (2004) 46
กับวิธีที่ดัดแปลงขึ้น

4.15 ความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น.....46
เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีเทียบกับ Environment agency (2004)

4.16 ผลการวิเคราะห์ *C. perfringens* ตัวอย่างน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ.....48

ค.1 อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็ง..... .70
ที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique
(ความเข้มข้นสปอร์ *C. perfringens* น้ำดื่ม 1 – 9 cfu/ml)

ค.2 อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็งที่.....70
ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique
(ความเข้มข้นสปอร์ *C. perfringens* น้ำดื่ม 1 – 9 cfu/ml)

จ.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน.....77
กับ Modified TSC medium

จ.2 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar.....77
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

จ.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 78
ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

จ.5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 81
โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

จ.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน 84
โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

จ.7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน 87
โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.1 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar 90
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่ม โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency 91
ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.3 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม Environment agency 94
ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน โดยการวิเคราะห์.....95
ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน 98
โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ฉ.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน.....101
โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar
และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ภาพที่ **หน้า**

2.1 เซลล์และสปอร์ของ C. perfringens.....3

2.2 (1) เซลล์ปกติก่อนเริ่มกระบวนการสร้างสปอร์.....5

(2) เซลล์พองขึ้นและมีการสะสมเม็ดแป้งขนาดใหญ่ (G คือ granulose).....5

(3) เซลล์สร้าง forespore septum (FS) 5

(4) เซลล์มี forespore (F) และ spore coat (C).....5

(5) เซลล์เริ่มสร้างผนังหุ้มสปอร์ (cortex) และการเจริญที่สมบูรณ์ของสปอร์.....5

(6) สปอร์เจริญเต็มที่ (S) และมีผนังหุ้ม (E).....5

(7) ลักษณะภายในและภายนอกสปอร์.....5

2.3 Kinetics ของการสร้างสปอร์และ enterotoxin โดย *C. perfringens* type A.....10

2.4 การเจริญของ *C. perfringens* บน SFP agar 20

2.5 สูตรโครงสร้างของ Sodium thioglycolate.....21

2.6 สูตรโครงสร้างของ L-cysteine.....21

4.1 การลดลงของ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง.....34
ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน

ง.1 ผลการทดสอบ Negler's test ของ *C. perfringens* ที่นำมาใช้ในการทดลอง.....73

ง.2 การตรวจสอบการเกิดสปอร์ก่อนนำไปให้ความร้อน.....74
โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

ง.3 ผลทดสอบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ 75
Environment agency ในการวิเคราะห์หา
C. perfringens type A เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็ง

ง.4 การหาค่า Relative detection level.....75

ง.5 การควบคุมคุณภาพ.....76

ง.6 Modified TSC broth เข้มข้น.....76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Clostridium perfringens เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนอุจจาระและสามารถอยู่รอดในดินและน้ำได้เป็นเวลานาน ทำให้สามารถตรวจพบได้ในดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนอุจจาระ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อนอุจาระอื่นๆไม่สามารถอยู่รอดได้แล้ว ปริมาณ *C. perfringens* จึงถูกนำมาประเมินการปนเปื้อนอุจจาระในน้ำจากสิ่งแวดล้อมแหล่งต่างๆ เช่น น้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน น้ำปากแม่น้ำ น้ำในมหาสมุทร เป็นต้น และเนื่องจากมีคุณสมบัติความทนต่อคลอรีน ทำให้ *C. perfringens* เหมาะแก่การเป็นดัชนีสำหรับตรวจสอบกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำ (Philip และ Chritopher, 2001) คลอรีนจะมีผลต่อแบคทีเรียที่เป็นดัชนีบ่งชี้ เช่น Coliforms และ *Escherichia coli* ในเวลารวดเร็วแต่เชื้อก่อโรคที่สามารถต้านทานต่อคลอรีนยังสามารถอยู่รอดได้อีกหลายชั่วโมง ทำให้เกิดความผิดพลาดในการป้องกันความปลอดภัยจากน้ำที่มีการทดสอบไม่พบ Coliforms และ *E. coli* และเกิดการเสี่ยงต่อการได้รับ *Giardia* cysts, *Crystosporidium* oocysts และไวรัสจากลำไส้คน ซึ่งทนต่อการบำบัด แต่คลอรีนมีผลต่อ *C. perfringens* เพียงเล็กน้อย (Araujo และ คณะ, 2004) และ *C. perfringens* ถูกกำหนดให้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนสำหรับน้ำดื่มในมาตรฐานน้ำดื่มของสหภาพยุโรป (Lenntech Water Treatment and Air Purification Holding, 1998)

ในประเทศไทยเชื้อ *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารชนิดหนึ่งที่ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 61 ปี พ.ศ. 2548 เรื่อง น้ำบริโภคบรรจุในภาชนะปิดสนิท และ ฉบับที่ 73 ปี พ.ศ. 2527 เรื่อง น้ำแข็ง กำหนดให้น้ำบริโภคบรรจุในภาชนะปิดสนิทและน้ำแข็งสำหรับบริโภคต้องไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ แต่จากผลการตรวจวิเคราะห์ *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็งสำหรับบริโภคพบแบคทีเรียดังกล่าวนี้ในจำนวนมาก ดังจะเห็นได้จากรายงานการวิเคราะห์คุณภาพน้ำและน้ำแข็งสำหรับบริโภคของสาธารณสุข จังหวัดเชียงราย พบว่า น้ำดื่มไม่ได้มาตรฐานร้อยละ 24 และน้ำแข็งไม่ได้มาตรฐานสูงถึงร้อยละ 57 เนื่องจากพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Coliforms, *E. coli*, *C. perfringens*

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. perfringens* นี้จะวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานต่างๆ โดยวิธีที่หน่วยงานวิเคราะห์ในประเทศไทยนิยมใช้ ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ของ International Organization of Standardization หมายเลขอ้างอิง ISO7937:2004(E) (ISO, 2004) หรือ Environment agency (2004) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง อีกทั้งยังต้องใช้อุปกรณ์พิเศษโดยเฉพาะในขั้นการการคัดแยกเชื้อโดย Tryptose-sulfite-cycloserine agar (TSC agar) ต้องทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน จึงต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการบ่มในอุปกรณ์ต่างๆที่สามารถควบคุมสภาวะได้ เช่น ในโถควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) และใช้ซองดูดซับออกซิเจน (anaerogen pack/gas pack) ซึ่งวัสดุและอุปกรณ์เหล่านี้มีราคาแพง สิ้นเปลืองและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ไม่เหมาะกับโรงงานผลิตน้ำดื่มหรือน้ำแข็งขนาดกลางและขนาดเล็กที่จะทำการตรวจสอบคุณภาพด้วยตัวเอง

ในการวิจัยนี้จึงต้องการดัดแปลงสูตรอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง โดยศึกษาการใช้ sodium thioglycolate ลดออกซิเจนในอาหารคัดแยกเชื้อ ทำให้ไม่ต้องทำการบ่มในอุปกรณ์ควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งมีราคาแพงและมีคุณภาพดีเทียบเท่ากับการใช้อาหารคัดแยกเชื้อ TSC agar ที่บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ทั้งนี้เพื่อควบคุมสภาวะการคัดแยกเชื้อ *C. perfringens* จากตัวอย่างน้ำและน้ำแข็งให้ผลการวิเคราะห์อยู่ในระดับที่น่าเชื่อถือ อีกทั้งการดัดแปลงดังกล่าวยังสามารถต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถดัดแปลงให้ใช้ได้ง่าย โรงงานผลิตน้ำดื่มและน้ำแข็งขนาดกลางและขนาดเล็กได้ใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตในโรงงาน อันเป็นผลต่อการยกระดับมาตรฐานการผลิตของประเทศ รวมถึงช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคในการบริโภคน้ำดื่มและน้ำแข็งจากโรงงานขนาดกลางและขนาดเล็ก

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็งสำหรับบริโภคได้โดยไม่ต้องทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีคุณภาพดีเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์ *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็ง จากสูตรของ TSC agar พร้อมทั้งปรับวิธีการวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น และทดสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) โดยการวิเคราะห์ในปริมาณตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO:7937 (ISO, 2004) และการวิเคราะห์ในปริมาณตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร เทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ Environment agency (2004) แล้วปรับความเข้มข้นของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์ *C. perfringens* ต่อปริมาตรน้ำหรือน้ำแข็งที่ละลายแล้ว 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 สัณฐานของ *C. perfringens*

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

C. perfringens เป็นแบคทีเรียรูปท่อนปลายตัด (blunt ends) ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 8.0-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2-4 ไมโครเมตร เซลล์ที่เริ่มเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จะมีรูปร่างสั้นหรือกลม ในขณะที่เซลล์ที่บ่มทิ้งไว้นานจะมีรูปร่างยาวกว่าและอาจต่อกันเป็นสาย (นันทนา อรุณฤกษ์, 2538) เซลล์ของ *C. perfringens* ส่วนใหญ่มีแคปซูลหุ้มเซลล์เป็น polysaccharides ซึ่งชนิดของ polysaccharides ที่เป็นแคปซูลจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และที่ผนังเซลล์จะพบน้ำตาล galactose, glucose และ rhamnose แตกต่างกันตามสายพันธุ์ (strain) และ ชนิด (type) (Holt และ คณะ, 1994) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปสามารถสร้างแคปซูลได้แต่มักไม่สร้างสปอร์ ถ้าสร้างสปอร์จะอยู่ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ (subterminal) โดยสปอร์จะทนต่อสารต้านการติดเชื้อทุกชนิด ยกเว้น formaldehyde และ glutaraldehyde แต่ vegetative cell มีความไวต่อความร้อนและสารต้านการติดเชื้อ ได้แก่ penicillin, erythromycin, cephalosporins, metronidazole, clindamycin แต่ดื้อยากลุ่ม aminoglycosides สำหรับลักษณะของเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* แสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 2.1 เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens*

ที่มา : Sacks และ Tompson (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

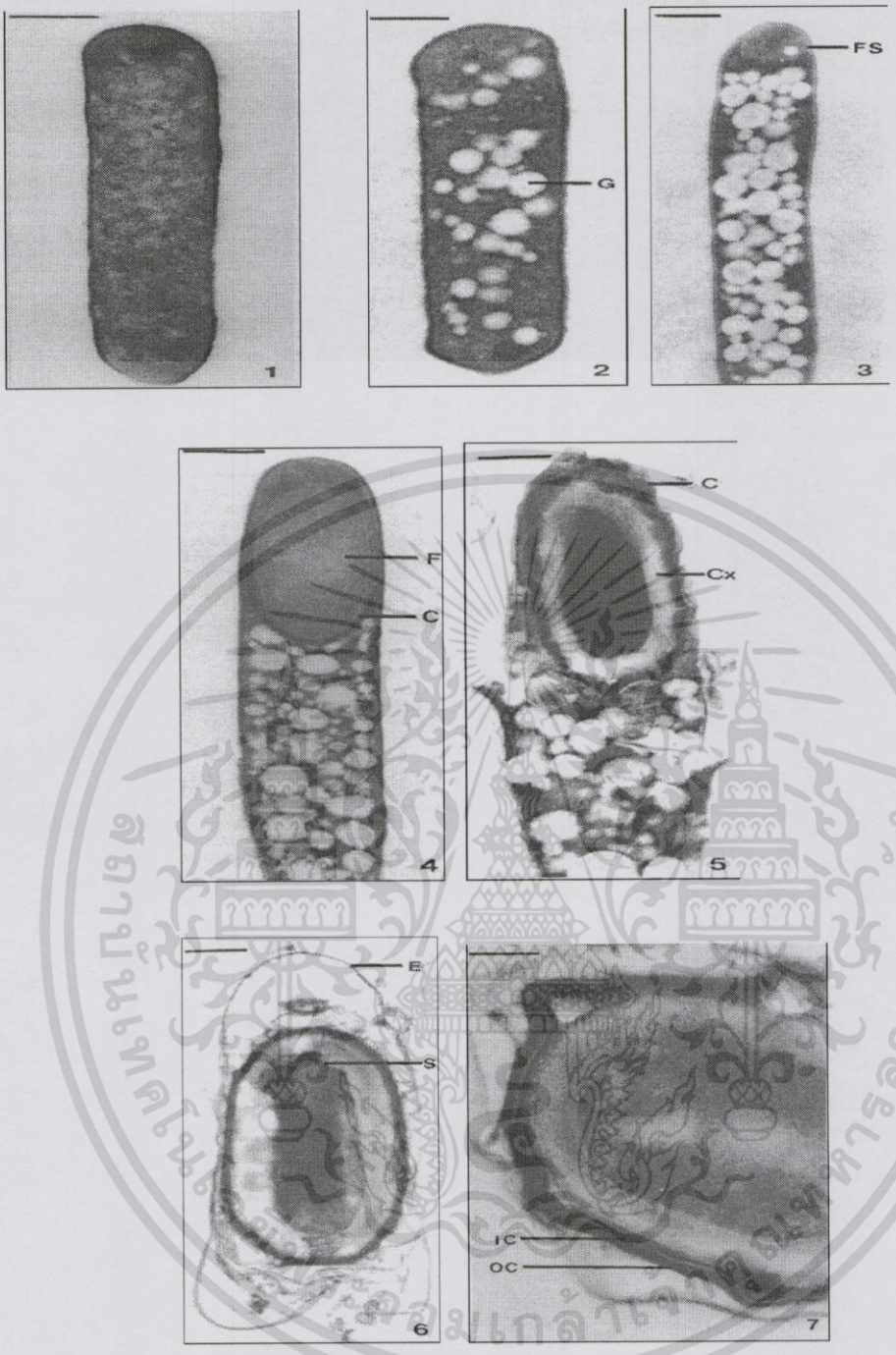
2.1.2 สปอร์ของ *C. perfringens*

2.1.2.1 ปัจจัยที่ทำให้เชื้อสร้างสปอร์

โดยปกติการสร้างสปอร์จะเกิดในช่วงปลายของ logarithmic phase เนื่องจากการขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหรือการสะสมผลิตภัณฑ์ขึ้นมา ในช่วงของการเปลี่ยนจากสภาพเซลล์ปกติ (vegetative cell) ไปเป็นสปอร์จะเกิดการสะสมแคลเซียมไอออนและมีการสร้าง dipicolinic acid (DPA) (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538)

การศึกษากระบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม Clostridium ทำได้ยาก เนื่องจากต้องทำการทดลองในสภาวะไร้ออกซิเจน และสารอาหารต้องสมบูรณ์ตามความต้องการของเชื้อ ถึง Clostridium จะเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์แต่ก็ยากที่จะสร้างสปอร์ ดังนั้น Long และคณะ (1982) ได้ศึกษากระบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม Clostridium โดยใช้ *C. acetobutylicum* เป็นตัวแทนของเชื้อในกลุ่มนี้ ศึกษากระบวนการสร้างสปอร์และความถี่ในการเปลี่ยนแปลงด้วยการย้อมสีและส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ากระบวนการสร้างสปอร์เริ่มจากเซลล์ที่เตรียมสร้างสปอร์จะมีการสะสมเม็ดแป้งขนาดใหญ่ (grunulose) พร้อมๆกับเซลล์จะพองขึ้นลักษณะคล้ายกับบุหรี่ซิกก้า ดังรูปที่ 2.2 (2) และเริ่มสร้าง forespore septum (FS) ดังรูปที่ 2.2 (3) เซลล์มีความเปลี่ยนแปลงชัดเจนเมื่อเริ่มสร้าง spore coat ก่อนที่จะสร้างส่วนประกอบภายในดังรูปที่ 2.2 (4) และ 2.2 (5) สำหรับ *C. acetobutylicum* มีโครงสร้าง exosporium เป็นรูปแท่งซึ่งจะมีเพียง 1 สปอร์ ดังรูปที่ 2.2 (6) ใน *C. acetobutylicum* จะเห็น spore coat ชัดเจนทั้งภายในและภายนอก ดังรูปที่ 2.2 (7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 (1) เซลล์ปกติก่อนเริ่มกระบวนการสร้างสปอร์

(2) เซลล์พองขึ้นและมีการสะสมเม็ดแป้งขนาดใหญ่ (G คือ granulose)

(3) เซลล์สร้าง forespore septum (FS)

(4) เซลล์มี forespore (F) และ spore coat (C)

(5) เซลล์เริ่มสร้างผนังหุ้มสปอร์ (cortex) และการเจริญที่สมบูรณ์ของสปอร์

(6) สปอร์เจริญเต็มที่ (S) และมีผนังหุ้ม (E)

(7) ลักษณะภายในและภายนอกสปอร์

ที่มา : Long และ คณะ (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 ผลของการเปลี่ยนเป็นสปอร์

สปอร์ของ *C. perfringens* ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่

- ทนต่อการให้ความร้อนชื้น (moist heat)
- ทนต่อความเป็นกรด-ด่าง แรงดันออสโมติกที่ไม่เหมาะสม
- Pro-longed frozen storage
- ความดันไอน้ำสูง (Akhtar และคณะ , 2009)

การผลิตสปอร์ทำให้ *C. perfringens* มีความทนทานอยู่ได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีสภาวะไม่เหมาะสม ประกอบด้วย อุณหภูมิ ความเป็นกรดหรือด่างไม่เหมาะสม และกระบวนการฆ่าเชื้อ เช่น การฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน สมบัตินี้ทำให้ *C. perfringens* เป็นจำพวกจุลินทรีย์พื้นฐานในลำไส้ ในลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่นอื่นๆมี *C. perfringens* อยู่ร้อยละ 13 ถึง 35 ของจุลินทรีย์พื้นฐานทั้งหมดไม่รวมจุลินทรีย์ที่หลักในอุจาระ เช่น *E. coli* ในน้ำทุกประเภท *C. perfringens* จะไม่เพิ่มจำนวน จึงทำให้ *C. perfringens* มีความจำเพาะสูงในการเป็นดัชนีบ่งชี้การมีมลภาวะจากการปนเปื้อนอุจาระ (WHO, 2006)

นอกจากนั้นคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมในน้ำและทนต่อกระบวนการฆ่าเชื้อของสปอร์ *C. perfringens* ทำให้ *C. perfringens* เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อน enteric viruses และโปรโตซัว ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม แต่ *C. perfringens* ไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจเฝ้าระวังปกติ เนื่องจาก

- สปอร์ของ *C. perfringens* อยู่รอดได้ยาวนานผิดธรรมชาติของเชื้อก่อโรคอื่นๆ รวมถึงไวรัสและโปรโตซัวด้วย
- สปอร์ของ *C. perfringens* มีขนาดเล็กกว่า protozone (oo) cysts ทำให้ไม่เหมาะสมในการบ่งชี้คุณภาพกระบวนการกรอง
- สปอร์ของ *C. perfringens* มีจำนวนน้อยในน้ำบางประเภทที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

ดังนั้น *C. perfringens* จึงเหมาะม สำหรับใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของกระบวนการมากกว่าการเฝ้าระวัง (WHO, 2006)

จากการศึกษาของ Paredes-Sabja และ คณะ (2007) พบว่าความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ *C. perfringens* มีผลมาจาก

- โครงสร้าง cortex peptidoglycan
- Spore's core หรือแกนกลางของสปอร์ มีปริมาณน้ำน้อย
- แกนกลางของสปอร์มี dipicolinic acid ปริมาณมาก

แต่เมื่อสปอร์ได้รับ L-asparagine และโพแทสเซียสไอออนจะเปลี่ยนเป็นเซลล์และระหว่างการเปลี่ยนเป็นเซลล์จะไวต่อการทำลายด้วยความร้อนและความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 สารพิษ

สารพิษของ *C. perfringens* แบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ A ถึง E ตามคุณสมบัติของความสามารถในการผลิตสารพิษ (ตามตารางที่ 2.1) โดยที่ alpha-toxin ผลิตโดยทุก type ยกเว้น type A1 strain ที่ไม่สร้าง alpha-toxin ในบางครั้ง alpha-toxin เป็น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+}-dependent phospholipase หรือ lecithinase-C ผลิตได้ในขณะที่มี Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} อิสระหรือขณะเจริญบน egg yolk agar และสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษได้โดยแอนติท็อกซินซึ่งเป็นพื้นฐานของ Nagler test (นันทนา อรุณฤกษ์, 2538)

ตารางที่ 2.1 สารพิษที่ผลิตโดย *C. perfringens* ชนิด (type) ต่างๆ

Toxins	Biological activity	Toxin type				
		A	B	C	D	E
Major (lethal)						
α	Lethal, lecithinase (phospholipaseC)	+	+	+	+	+
β	Lethal, necrotizing trypsin labile	-	+	+	-	-
ε	Lethal, permease, trypsin activatable	-	+	-	+	-
ι	Lethal, dermonecrotic, binary, ADP-ribosylating	-	-	-	-	+
Minor						
γ	Not defined, existence questionable	-	±	±	-	-
δ	Hemolysin	-	±	+	-	-
η	Not defined, existence questionable	±	-	-	-	-
θ	Hemolysin (O_2-labile), cytolysin	±	+	+	+	+
κ	Collagenase, gelatinase	+	+	+	+	+
λ	Protease	-	+	-	+	+
μ	Hyaluronidase	±	+	±	±	±
ν	Deoxyribonuclease	±	+	+	±	±
Neuraminidase	N-acetylneuraminic acid glycohydrolase	+	+	+	+	+
Other						
Enterotoxin	Enterotoxic, cytotoxic	+	nt	+	+	nt

ที่มา : Borriello และคณะ (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.1 Major toxin (Borriello และคณะ, 2005)

ก. α- Toxin *C. perfringens* type A จะผลิต α- Toxin ได้มาก ซึ่งก็คือ phospholipase C lecithinase และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดอาการ gas gangrene โดยสารพิษชนิดนี้จะมีสังกะสีเป็นส่วนประกอบและต้องการ calcium ions สำหรับการจับกับ substrate ตอบสนองต่อ lecithinase reaction บนอาหารคัดแยกเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบ และการเกิด hazy zone ของ hemolysis บน blood agar

การเกิดโรคเกิดจากเชื้อทำลายเม็ดเลือดแดงและเซลล์เนื้อเยื่อโดยการย่อยสลาย lecithin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น มีผลทำให้เนื้อเยื่อตาย เป็นพิษต่อตับและกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้เกิดอาการโลหิตเป็นในคน

ข. β-Toxin หรือ necrotizing โดย *C. perfringens* type B และ C จะผลิต β- Toxin ได้มาก ในการทดลองฉีดเข้าหลอดเลือดดำของหนู หนูจะเกิดอาการเกร็งและตายเกือบทันที

Nercrotizing Enteritis หรือโรคลำไส้เน่าอักเสบ มีอาการติดเชื้อรุนแรงเฉียบพลันที่บริเวณต่ำกว่าช่องท้อง ท้องเสียเป็นเลือด อาเจียน ซึ่งการติดเชื้อ *C. perfringens* typeA จะไม่มีการอาเจียน การอักเสบที่ลำไส้ช่วงกลางและลำไส้เล็ก เมื่อเชื้อสร้าง α- toxin และ β-toxin ปริมาณมากจะทำให้เซลล์ตาย ผลจาก β- toxin จะทำให้เกิดอาการอัมพาตของลำไส้ เกิดอาการเลือดออกในลำไส้ เนื้อเยื่อตาย(necrosis) โรคนี้มักเกิดขึ้นในเด็กเล็ก

ค. ε-Toxin เป็นพวก prototoxin จะทำปฏิกิริยาโดย proteolytic enzyme ผลิตโดย type B และ D เป็นสาเหตุของอาการไตบวม ในปอดและเยื่อบุหัวใจมีของเหลวเกิน และทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษจากลำไส้ (enterotoxemia) ทำให้เนื้อเยื่อตาย

ง. ι-Toxin ที่ผลิตโดย *C. perfringens* คล้ายกับ ι-Toxin ที่ผลิตโดย *C. spiroforme* ทั้งในการทดสอบ serological biological และ enzymatic activities

จ. Enterotoxin เป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่ผลิตโดย *C. perfringens* type A และ *C. perfringens* enterotoxin (CPE) ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในคน โดย gene (*cpe*) ของ *C. perfringens* type A พบได้บนโคโมโซมและพลาสมิด แต่จากการวิเคราะห์ *cpe* gene ในอาหารที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษพบว่า *cpe* gene อยู่บนโคโมโซมและในทางกลับกัน *cpe* gene บนพลาสมิด พบในการวิเคราะห์จากอาหารที่ไม่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในคน ดังเช่นในตารางที่ 2.2 นอกจากนั้นเซลล์หรือสปอร์ที่มี *cpe* gene อยู่บนโครโมโซมยังทนความร้อนได้ดีกว่าเซลล์หรือสปอร์ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิด เช่น ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถแยกเซลล์หรือสปอร์ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซม ได้มากกว่าเซลล์หรือสปอร์ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิดถึง 60 เท่า (Li และ McClane, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างสายพันธุ์ *C. perfringens* ที่มี *cpe* gene อยู่บนโครโมโซม *cpe* gene บนพลาสมิด และไม่มี *cpe* gene บนพลาสมิด

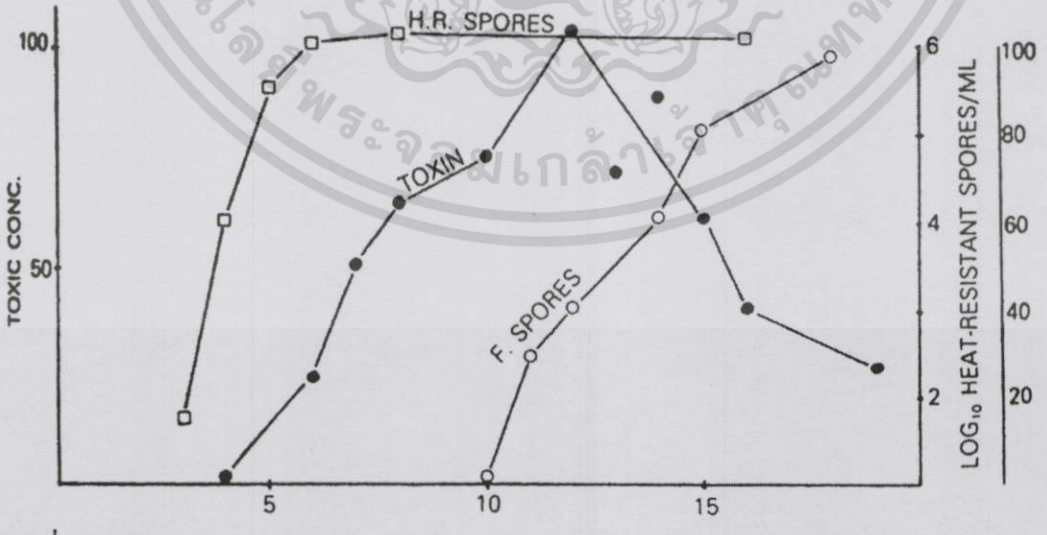
Isolate	Source	Genotype
NB16	Human antibiotic-associated diarrhea, Europe, 1980s	Plasmid *cpe*, IS*1151*
T34058	Human antibiotic-associated diarrhea, North America, late 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1470*-like
F4969	Human sporadic diarrhea, Europe, 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1470*-like
F5603	Human sporadic diarrhea, Europe, 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1151*
153	Pig enteritis, Scotland, 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1470*-like
222	Dog diarrhea, United States, 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1470*-like
458	Dog diarrhea, North America, early 1990s	Plasmid *cpe*, IS*1470*-like
NCTC8239	Food poisoning outbreak, Europe, 1950s	Chromosomal *cpe*
NCTC10239	Food poisoning outbreak, Europe, 1950s	Chromosomal *cpe*
C-1841	Vermont food poisoning outbreak, 1980s	Chromosomal *cpe*
FD1041	North American food poisoning outbreak, 1980s	Chromosomal *cpe*
E13	Food poisoning outbreak, North America, 1960s	Chromosomal *cpe*
191-10	Food poisoning outbreak, Hawaii, 1980s	Chromosomal *cpe*
01E809	Food poisoning outbreak, Oklahoma, 1999	Chromosomal *cpe*
Pork-1	American retail food, 2003	Chromosomal *cpe*
Sausage-1	American retail food, 2003	*cpe* negative
Fish-2	American retail food, 2003	*cpe* negative
Steak	American retail food, 2003	*cpe* negative
ATCC 3624	Control	*cpe* negative

ที่มา : Li และ McClane (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาโดย Li และ McClane (2006) เปรียบเทียบการทนต่ออุณหภูมิต่ำของเซลล์หรือสปอร์*C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซมกับเซลล์หรือสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิด ที่ถูกแช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซม สามารถมีชีวิตรอดมากกว่าเซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิดถึง 8 เท่า และที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซม สามารถมีชีวิตรอดมากกว่าเซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิดถึง 3 เท่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 เดือน ของการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส เซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิด ลดต่ำลงมากกว่าเซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซมถึง 4 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ และยังพบว่าเซลล์และสปอร์ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซม เมื่อผ่านการแช่แย็นและแช่แข็งที่อุณหภูมิดังกล่าวแล้ว เมื่อนำมาบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 37 และ 43 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีกว่า *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิด อย่างมีนัยสำคัญ การทดลองดังกล่าวสนับสนุนว่า อาหารที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในคนจาก *C. perfringens* enterotoxin คัดแยกได้ *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซม เนื่องจากทนทานต่ออุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิสูง และเจริญได้ดีกว่า *C. perfringens* type A ที่มี *cpe* gene บนพลาสมิด

Enterotoxin เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์ที่มีกระบวนการสร้างสปอร์ในช่วงท้ายของการสร้างสปอร์ การผลิต enterotoxin สูงสุดคือก่อนการสลายตัวของเซลล์ที่สร้างสปอร์และถูกปล่อยออกมาพร้อมสปอร์ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 Kinetics ของการสร้างสปอร์และ enterotoxin โดย *C. perfringens* type A

ที่มา : Li และ McClane (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *C. perfringens*

2.2.1 ปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเจริญของ *C. perfringens*

2.2.1.1 Anaerobiosis

C. perfringens เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไม่มีส่วนประกอบหรือเอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยากับออกซิเจน โดยจะได้รับพลังงานส่วนใหญ่จากการกระบวนการหมักสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนในตอนต้น และรับอิเล็กตรอนในตอนท้ายของกระบวนการ (Borriello และคณะ, 2005) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักมักเป็นกรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์จากคาร์โบไฮเดรตหรือเปปโตน (Lederberg, 2000) จากการศึกษาของ Shimizu และคณะ (2001) พบว่า *C. perfringens* มีรหัสพันธุกรรมที่แสดงถึงการมีเอนไซม์สำหรับวงจรไกลโคไลซีส และไกลโคเจนเมตาบอลิซึมที่สมบูรณ์ ไม่มีรหัสพันธุกรรมของเอนไซม์สำหรับวงจรกรดไตรคาร์บอกไซลิก (TCA cycle)

ในกระบวนการหมัก pyruvate จะถูกเปลี่ยนเป็น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ reduced ferredoxin ซึ่งอิเล็กตรอนของมันถูกย้ายไปเป็นโปรตอนโดย hydrogenase สุดท้ายได้เป็นโมเลกุลของไฮโดรเจน ซึ่งจะถูกปล่อยออกจากเซลล์พร้อมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ในเนื้อเยื่อที่ *C. perfringens* อาศัยอยู่มีสภาวะไร้ออกซิเจนมากขึ้นเหมาะสมแก่การเจริญ (Shimizu และคณะ, 2001)

2.2.1.2 กระบวนการเมตตาบอลิซึมคาร์โบไฮเรต โปรตีน และนิวคลีโอไทด์

C. perfringens สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด ได้แก่ fructose, galactose, glycogen, lactose, maltose, mannose, raffinose, sucrose และแป้ง เนื่องจากในจีโนมมียีนที่หลากหลายสำหรับไกลโคไลติกเอนไซม์ ได้แก่ α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase, β-glucosidase, β-glucuronidase, β-fructofranosidase (sucase), α-mannosidase, pullulanase, α-amylase และ endo-1,4-β-xylanase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะไปย่อยพันธะในน้ำตาลให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ (Shimizu และคณะ, 2001) ซึ่ง momosaccharides จะถูกนำไปใช้ใน Embden-Meyerhof-Parnas pathway ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เป็นตัวกลางที่จะเปลี่ยนเป็น pyruvate คือ acetate และ ethanol หรือแอลกอฮอล์อื่นๆ เช่น isopropanol, butanol และ 1,2-propandiol (Borriello และคณะ, 2005)

C. perfringens ไม่มีเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ arginine, aromatic amino acid, branched-chain amino acid, glutamate, histidine, lysine, methionine, serine และ threonine ทำให้ *C. perfringens* ไม่สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีกรดอะมิโนมาสนับสนุนการเจริญที่จำกัด (Shimizu และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญของ *C. perfringens*

2.2.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 37 ถึง 45 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อเจริญอยู่ แต่การให้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างรวดเร็วสามารถหยุดกิจกรรมของเซลล์ *C. perfringens* ได้ *C. perfringens* จะทนต่ออุณหภูมิได้ดีในอาหารมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากสารอาหารที่จะเปลี่ยนเป็นไขมันที่อยู่ในอาหาร (Doyle, 1995)

2.2.2.2 Oxidation-Reduction Potential (Eh)

C. perfringens เป็นเชื้อในกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต จึงไม่เจริญเป็นโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่สัมผัสกับอากาศ สำหรับอาหารแข็งอาจใช้ anaerobic chambers ซึ่งอาศัยการดึงออกซิเจนออกไปหรือระบบการแทนที่ออกซิเจนเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ *C. perfringens* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีการทำให้ ค่า E_h เหมาะสม เช่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย reducing agents ดังเช่น cysteine และ sodium thioglycolate แต่อย่างไรก็ตาม sodium thioglycolate อาจจะเป็นพิษกับบางสายพันธุ์ บางครั้งอาจใช้การเติมวุ้นความเข้มข้นต่ำ (0.1-0.3%) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวการต้มในน้ำร้อนประมาณ 15-20 นาที ก็สามารถไล่ออกซิเจนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ทั้งนี้การตอบสนองของ *C. perfringens* ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ปริมาณเชื้อที่เพาะ ลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น และสภาวะการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Doyle, 1995)

2.2.2.3 Water Activity (a_w)

a_w ที่เหมาะสมมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่าง, Eh, อุณหภูมิ และสารละลายที่เติมเพื่อลดค่า a_w โดยทั่วไป *C. perfringens* จะเจริญในช่วง 0.97 ถึง 0.95 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมซูโครส กลูโครส หรือโซเดียมคอร์ไรด์เพื่อลดค่า a_w แต่ผลของการเติมเกลือมีผลกับการเจริญของเชื้อ เพราะเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5% (a_wเท่ากับ 0.97) ซึ่งลดลงเร็วกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล 18% (a_wเท่ากับ 0.95) (Doyle, 1995)

2.2.2.4 ความเป็นกรด-ด่าง

C. perfringens เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 – 7.0 ซึ่งเหมือนกับค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อหรือเนื้อสัตว์ปีกโดยส่วนใหญ่ และสามารถอยู่รอดได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 – 8.3 (Doyle, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.5 เกลือ

เกลือโซเดียมไนไตรท์ สามารถป้องกันการเจริญของ *C. perfringens* ได้ แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเชื้อ ผลจากการให้ความร้อน เกลือโซเดียม ไนไตรท์ ในอาหารที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งทำให้ปริมาณเกลือโซเดียมไนไตรท์ลดลงแต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia มากขึ้น หรือที่เรียกว่า "Perigo effect" และสำหรับโซเดียมคลอไรด์ 7-8% ก็สามารถป้องกันการเจริญของ *C. perfringens* ได้ทุกสายพันธุ์ (Doyle, 1995)

2.3 การอยู่รอดหรือทนทานสภาวะไม่เหมาะสมของ *C. perfringens*

2.3.1 การทนทานของ *C .perfringens* เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ

เซลล์ของ *C .perfringens* มีความไวต่อการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ โดย *C. perfringens* ที่เจริญอยู่ในระยะ stationary จะทนต่อการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมากกกว่า *C. perfringens* ที่เจริญอยู่ในระยะ logarithmic ซึ่ง *C. perfringens* จะลดลงร้อยละ 80 ถึง 90 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเซลล์ *C. perfringens* มีความไวต่อการแช่แข็ง จากการศึกษาในอาหารหลายๆชนิดที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าเซลล์ของ *C. perfringens* ลดลงประมาณร้อยละ 99.5 แต่จำนวนสปอร์ไม่ลดลงในสภาวะเดียวกัน (Doyle, 1995)

การแช่เย็นเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมการผลิตอาหาร การแช่เย็นที่ไม่ดีเป็นสาเหตุหลักประการหนึ่งของการเกิดการระบาดของอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens* ทั้งการ แช่เย็นและแช่แข็งถูกใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บอาหารที่ปรุงแล้วและวัตถุดิบ ดังนั้น Li และ McClane (2006) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซมซึ่งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหารที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ และ *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนพลาสมิด ทดลองที่อุณหภูมิแช่เย็น (4°C) และแช่แข็ง (-20°C) สรุปได้ว่า vegetative cells และ spores ของ *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซม อยู่รอดในการแช่เย็นและแช่แข็งได้ดีกว่า vegetative cells และ spores ของ *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บน พลาสมิดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นยังพบว่า *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซมที่คัดแยกจากเนื้อหมูที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ทนต่อการแช่เย็น และแช่แข็งได้ดีกว่าที่คัดแยกได้จากอาหารที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ จากการศึกษานี้สนับสนุนว่า *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซมมีความแข็งแรง และมีความสัมพันธ์กับอาหารที่เป็นพิษ ไม่ได้มีสาเหตุมาจาก *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซมทนทานต่อความร้อนอย่างเดียว แต่มีสาเหตุมาจากความทนทานต่อความอุณหภูมิต่ำที่ใช้เก็บรักษาอาหารด้วย *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซมมีความสามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิต่ำ และเพิ่มจำนวนจนสามารถตรวจพบได้ โดยสปอร์สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ในสภาวะที่ทดสอบ หลังจากแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สปอร์ของ *C. perfringens* ที่มียีนส์ *cpe* บนโครโมโซม ลดลงเพียง 1-log

2.3.2 การทนทานของ *C .perfringens* เมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง

การปนเปื้อน *C. perfringens* ทำให้คนจำนวนมากเกิดอาการอาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริกา โดยในปี ค.ศ.2007 มีคนเกิดอาการอาหารเป็นพิษสูงถึง 248,000 ราย สาเหตุเกิดจากเมื่อสปอร์ของ *C. perfringens* ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตแล้วสามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในกระบวนการได้และสปอร์จะงอกเป็นเซลล์ ถ้าอาหารนั้นไม่ผ่านการแช่เย็น เมื่ออาหารที่มีการปนเปื้อนถูกบริโภค เซลล์ *C. perfringens* จำนวนมากที่ปนเปื้อนอยู่สามารถอยู่รอดได้ในกระเพาะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และเริ่มกระบวนการสร้างสปอร์ในลำไส้เล็ก ในระหว่างกระบวนการสร้างสปอร์จะได้ enterotoxin (CPE) เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่ง *C. perfringens* ที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษจะมี *cpe* gene บนโครโมโซม และ *C. perfringens* ที่มี *cpe* gene บนโครโมโซมจะทนต่อความร้อนได้สูงกว่า *C. perfringens* ที่ไม่มี *cpe* gene บนโครโมโซม (Orsburn และคณะ (2008)

Orsburn และคณะ (2008) ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงสาเหตุที่ *C. perfringens* ที่มี *cpe* gene ทนต่อความร้อนได้ดีกว่า *C. perfringens* ที่ไม่มี *cpe* gene โดยเลือกตัวแทนของ *C. perfringens* สายพันธุ์ CPE^+ คือ NCTC 8239, NCTC 8679 และ NCTC 10240 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหารที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ และ SM101 ซึ่งดัดแปลงจาก NCTC 8798 ตัวแทน *C. perfringens* สายพันธุ์ CPE^- คือ FD-1 และ T-65 ซึ่งคัดแยกได้จากอาหารที่ไม่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ จากการทดสอบการทนทานต่อความร้อนพบว่า *C. perfringens* สายพันธุ์ CPE^+ ทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่า *C. perfringens* สายพันธุ์ CPE^- ดังตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ของ *C. perfringens*

สายพันธุ์	CPE	*D* value ที่ 90°เซลเซียส (นาที)	ความหนาแน่น (กรัม/มิลลิลิตร)	% น้ำ
NCTC 8239	+	120.6 ± 4.5	1.329 ± 0.006	51.6 ± 2.4
NCTC 8679	+	45.6 ± 9.4	1.333 ± 0.008	50.0 ± 3.2
SM101	+	21.4 ± 0.8	1.308 ± 0.004	59.8 ± 1.6
NCTC 10240	+	19.9 ± 2.4	1.308 ± 0.006	59.8 ± 2.4
3663	+	19.0 ± 2.1	1.306 ± 0.010	60.6 ± 3.9
FD1	–	12.5 ± 4.6	1.307 ± 0.006	60.2 ± 2.4
T-65	–	10.1 ± 1.6	1.316 ± 0.006	56.7 ± 2.4
ATCC 3624	–	6.9 ± 0.7	1.322 ± 0.005	54.3 ± 2.0
13V1	–	5.5 ± 1.6	1.296 ± 0.006	64.6 ± 2.4

ที่มา Orsburn และคณะ (2008)

Orsburn และคณะ (2008) สรุปสาเหตุที่ *C. perfringens* ที่มี *cpe* gene ทนต่อความร้อนได้ดีกว่า *C. perfringens* ที่ไม่มี *cpe* gene เป็นผลมาจากความเข้มข้นของ DPA และโลหะไอออน ขนาดของ spore core และ protoplast-to-sporoplast ratio และยังพบอีกว่าความสัมพันธ์ระหว่าง cortex และ peptidoglycan ในผนังเซลล์ที่งอกมีบทบาทกับการทนต่อความร้อนเช่นกัน

สำหรับความร้อนที่สปอร์ *C. perfringens* อยู่รอดได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อเจริญอยู่ ดังเช่นในตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ *C. perfringens*

เวลา		D-Value	สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ
(°เซลเซียส)	(°ฟาเรนไฮต์)	(นาที)		
55	131	179	NCTC 8798	Ground beef
57	134.6	34.9	NCTC 8798	Ground beef
59	138.2	16.9	NCTC 8238	Ground beef
61	141.8	3.9	NCTC 8238	Ground beef
98.9	210	31.4	NCTC 8798	Beef gravy
100	212	17.6	NCTC 8238	SEC broth
104.4	219.9	8	NCTC 10240	Beef gravy
110	230	0.95	NCTC 10240	Beef gravy
115.6	240.1	0.21	NCTC 10240	Beef gravy

ที่มา : Tom (2007)

2.3.3 การสร้างเยื่อ (biofilms) เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม

C. perfringens อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานานเนื่องจาการสร้างเอ็นโดสปอร์ แต่การสร้างเอ็นโดสปอร์นั้นจะเกิดในระยะ dormant ดังนั้น *C. perfringens* ไม่สามารถปรับตัวได้ทันทีเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว การสร้างเยื่อเมือกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของ *C. perfringens* ที่จะป้องกันสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ในธรรมชาติแบคทีเรียจะสร้างเยื่อเมือกในระยะ predormant การสร้างเยื่อเมือกมีผลทำให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนไม่เหมาะสมและทนต่อสารปฏิชีวนะ การสร้างเยื่อเมือกเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น คาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างเยื่อเมือกเป็นการตอบสนองต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่จำกัดของโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการ catabolite

C. perfringens มีความสามารถในการสร้างฟิล์ม (biofilms) เพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะ oxidative ไม่เหมาะสม เช่นในอากาศที่มีออกซิเจนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากการทดลองของ Varga และคณะ (2008) ซึ่งได้คัดเลือก *C. perfringens* จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่เป็นสาเหตุของอาการ gangrene และสารปฏิชีวนะที่ให้เพื่อรักษาอาการ gangrene มีผลช้ากับอาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อาหารเป็นพิษที่เกิดจากสายพันธุ์เหล่านี้ ได้แก่ SM101 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะอากาศที่มีออกซิเจนได้ (aerotolerant) โดยทดลองเปรียบเทียบระหว่าง *C. perfringens* ที่พบในธรรมชาติกับสายพันธ์ที่ถูกเปลี่ยนแปลง CcpA protein ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากัน พบว่า การสร้างเยื่อเมือกควบคุมโดย CcpA protein เนื่องจาก *C. perfringens* ที่พบในธรรมชาติมีอัตราการสร้างเยื่อเมือกเพื่อการเจริญแบบ planktonic สูงกว่า *C. perfringens* ที่ถูกเปลี่ยนแปลง CcpA proteine และยังพบว่าการสร้างเยื่อเมือกมีผลในการปกป้อง *C. perfringens* จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมประกอบด้วย บรรยากาศที่มีออกซิเจน ไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ penicillin G

2.3.4 ความต้านทานสารปฏิชีวนะ

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาความต้านสารปฏิชีวนะของ *C. perfringens* ที่แยกได้จากอุจจาระคน อุจจาระหมู อาหาร(ส้มตำปู) สมุนไพร น้ำดื่ม น้ำแข็งและเครื่องสำอาง โดยทดสอบการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด คือ ceftriaxone, chloramphenicol, imipenem, metronidazole, penicillin G, tetracycline และ vancomycin พบว่า *C. perfringens* 56.2% สามารถต้านทาน tetracycline รองลงมาคือ imipenem (24.9%), metronidazole (9.5%), penicillin G (9%), vancomycin (4.5%), chloramphenicol (3%) และ ceftriaxone (1%) (Tansuphasiri และคณะ, 2005)

2.4 การวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดแยกเชื้อ

2.4.1 อาหารคัดแยกเชื้อชนิดเหลว

จากการทดลองของ Bezirtzoglou และคณะ (1996) พบว่า LS broth สามารถให้ผลการทดสอบที่ดีในตัวอย่างที่มีจำนวน *C. perfringens* สูงโดยไม่ต้องทำการทดสอบยืนยัน แต่ในตัวอย่างที่มีจำนวน *C. perfringens* ปริมาณต่ำ LS broth ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ และจากการทดลองของ Harmon และ Kautter (1987) ยังพบอีกว่า MPN methods โดยใช้ LS medium และ IM medium ไม่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ *C. perfringens* ในตัวอย่างอุจจาระแต่ TSC agar และ TSB agar สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ดี

2.4.2 อาหารคัดแยกเชื้อชนิดแข็ง

Tryptose sulfite cycloserine (TSC) agar เป็นอาหารคัดแยกเชื้อสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* ในอาหารและเครื่องดื่มที่มักระบุในวิธีวิเคราะห์มาตรฐานต่างๆ จากการทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* ในการทดลองของ Jong และคณะ (2003) ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* 4 ชนิด คือ Iron sulfite (IS) agar, Tryptose sulfite cycloserine (TSC) agar, Sulfite cycloserine azide (SCA) agar และ Differential clostridial agar (DCA) พบว่า IS medium ไม่มีประสิทธิภาพในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
105477

คัดแยกเชื้อ ขณะที่ DCA ทำให้สีของโคโลนีของ *C. perfringens* ผิดไป วิธีการเตรียม SCA และ DCA ยุ่งยาก ดังนั้น TSC agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* เหมาะสมที่สุด

อาหารคัดแยกเชื้อชนิดแข็งที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์ *C. perfringens* ได้แก่ Tryptose sulfite cycloserine agar (TSC agar), Sheahidi ferguson perfringens medium (SFP), Sulfite polymyxin sulfadiazine (SPS) agar, Fluorocult TSC (TSCF) Agar ประกอบไปด้วย sodium metabisulfite และ ferric ammonium citrate ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การรีดิวซ์ซัลไฟด์ (Philip และ Christopher, 2001) และใช้ผลจากสารยับยั้งต่างๆได้แก่ neomycin, polymyxin, sulfadiazine หรือ D-cycloserine ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของกลุ่ม enterococci ได้ทั้งหมด แต่ทั้งหมดนี้ก็ทำการทดสอบยืนยัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆใน สปีชีส์ Clostridium ก็ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกัน เช่น TSC และ EY-freeTSC agar เชื้ออื่นๆในกลุ่ม Sulfite-reducing clostridia ได้แก่ *C. bifermentans, C. botulinum, C. paraperfringens* (*C. baratii*), *C. sardiniense* (*C. absonum*) และ *C. sporogenes* ก็สามารถเจริญและปรากฏเป็นโคโลนีสีดำเช่นเดียวกับ *C. perfringens* (Downes และ Ito, 2001)

ต่อมาในวิธีการวิเคราะห์ *C. perfringens* ในน้ำดื่มของ The European Directive เสนอให้ใช้ mCP agar แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าอาหารเลี้ยงคัดแยกเชื้ออื่นๆสามารถใช้ในการหาจำนวน *C. perfringens* ในน้ำที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพแล้ว หรือน้ำบาดาลได้ดีกว่า

สำหรับ TSCF agar คือ TSC agar ที่เติม disodium salt ของ metabolize 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) จะเป็นซับสเทรทที่จะไปจับกับเอนไซม์ acid phosphatase (Araujo และ Christopher, 2004) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น methylumbelliferone ภายใต้แสงยูวีจะเรืองแสง (Philip และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นตัวชี้เฉพาะสำหรับ *C. perfringens* ทำให้ไม่ต้องทำการทดสอบยืนยันอีก (Araujo และคณะ, 2004) และ สารอีกตัวที่มีการนำมาเติมลงใน TSC agar เพื่อให้สามารถทำการวิเคราะห์ *C. perfringens* ได้ในขั้นตอนเดียวคือ *ortho*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ β-galactosidase ของ *C. perfringens* ได้ *ortho*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารที่ให้สี (Philip และคณะ, 2001)

Araujo และคณะ (2004) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบอาหารคัดแยกเชื้อ *C. perfringens* 6 ชนิด คือ TSCF agar, mCP agar, TSC agar, TSN agar และ SPS agar โดยวิธี membrane filtration technique และอาหารคัดแยกเชื้อ Wilson–Blair agar (WB) โดยวิธี the still-in-force Spanish official method ในการวิเคราะห์สปอร์ของ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำบาดาล สรุปได้ว่า mCP ไม่สามารถคัดแยกเชื้อ *C. perfringens* ได้ครบถ้วนในตัวอย่างน้ำบาดาล และ TSCF agar สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ *C. perfringens* ได้เทียบเท่ากับอาหารคัดแยกเชื้ออื่นๆที่ทำการทดลองเปรียบเทียบ แต่สามารถให้ผลที่ชัดเจนกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การวิเคราะห์ *C. perfringens* โดยชุดทดสอบ

ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ *C. perfringens* ที่มีจำหน่ายเป็นการค้า แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์ *C. perfringens* ที่มีจำหน่ายเป็นการค้า

ชุดทดสอบ	วิธีวิเคราะห์	เวลาทั้งหมด	ผู้จำหน่าย
A presumptive test for *C. perfringens*	Uses prepared traditional media	48 h	Biomedix Co,Ltd.
ISO-GRID Method for *C. perfringens* Count using Modified TSC agar	Membrane filtration with selective culture medium	24 h for presumptive enumeration and 48 h additional to confirm presumptive positive results)	Neogen Corporation
PET-RPLA TD930 [Used to identify *C. perfringens* type A]	Reversed passive latex agglutination	24 h (feces) 48 h (bacterial culture)	Oxoid Co,Ltd.

ที่มา : Tom (2007)

2.6 สมบัติของโถควบคุมสภาวะ และซองดูดซับออกซิเจน

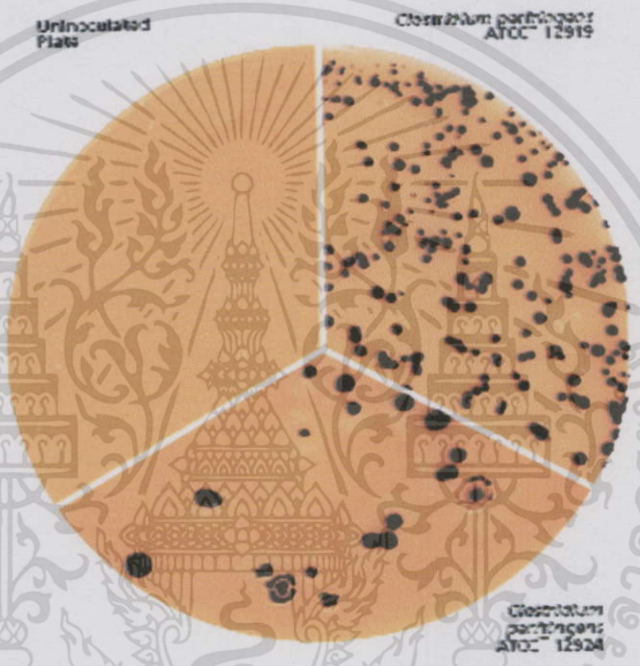
Anerobic jar หรือโถปิดสนิทใช้ร่วมกับซองผลิตก๊าซ เช่น GasPak ที่มีจำหน่ายทั่วไปจะมีผลึก palladium ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนที่ได้จะจับกับก๊าซออกซิเจนที่มีอยู่ในโถเปลี่ยนเป็นน้ำ และออกซิเจนจากภายนอกไม่สามารถเข้าไปภายในโถได้ ทำให้ภายในโถปราศจากออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 สมบัติของ Tryptose sulfite cyccloserine (TSC) agar หรือ SFP agar

TSC agar หรือ SFP agar ประกอบด้วย

- Peptone เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามินและแร่ธาตุ
- Yeast extract ให้วิตามิน B-complex
- Ferric ammonium citrate และ Sodium sulfite เป็นดัชนีชี้วัดการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดย Clostridia จะรีดิวซ์ซัลเฟตเป็นซัลไฟด์ไปทำปฏิกิริยากับเหล็กเปลี่ยนเป็นสีดำ (iron sulfite)



รูปที่ 2.4 การเจริญของ *C. perfringens* บน SFP agar

ที่มา : Zimbro and Power (2003)

2.8 สมบัติของ D-Cycloserine

D-Cycloserine มีสูตรโครงสร้างคือ $C_3H_6N_2O_2$ เหมือนกับโครงสร้างของ D-alanine มีฤทธิ์สารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจากเชื้อ *Streptomyces orchidaceus* หรือ *S. garphalus*

D-cycloserine ที่ความเข้มข้น 100 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลเคนหรือยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยขวางกั้นเปลี่ยนรูปแบบจาก L-alanine เป็น D-alanine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

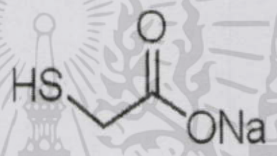
ในการทดลอง D-cycloserine มีฤทธิ์ในการต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli, Staphylococcus aureus, Nocordia spp.* และ *Chlamydia spp.* อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง mycrobacteris บางสายพันธุ์ ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis*

ในธรรมชาติมีรายงานการตรวจพบ D-cycloserine ในพลาสมาและ ปัสสาวะโดยใช้เครื่อง HPLC อีกทั้งวิธี Colormetric method ตรวจพบ D-cycloserine จากของเหลวภายในสิ่งมีชีวิตอีกด้วย

โดยทั่วไป D-cycloserine จะถูกเตรียมเป็นสารละลายก่อนนำไปใช้เนื่องจากในธรรมชาติหรือในสารละลายกรด D-cycloserine จะไม่เสถียร แต่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 10 ซึ่งเตรียมจากโซเดียมคาร์บอเนตสามารถเก็บ D-cycloserine ได้นาน 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2 ถึง 8 องศาเซลเซียส

2.9 สมบัติของ Sodium thioglycolate

Sodium thioglycolate มีสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้าง sodiumthioglycolate

ที่มา : www.wikipedia.com

Sodium thioglycolate มีคุณสมบัติเป็น reducing agent แต่ก็เป็นพิษกับ *C. perfringens* บางสายพันธุ์ (Doyle, 1995)

2.10 สมบัติของ Cysteine

Cysteine เป็นกรดอะมิโน มีสูตรทางเคมีคือ $HO_2CCH(NH_2)CH_2SH$ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.6

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ L-cysteine

ที่มา : www.wikipedia.com

Cysteine ประกอบด้วยอะตอมของกำมะถันเชื่อมต่อกับไอออนของโลหะหนัก ภายใต้ภาวะออกซิไดซิ่ง cysteine 2 โมเลกุลสามารถเชื่อมต่อซึ่งกันและกันได้โดยพันธะไดซัลไซล์ (disulfide bond) และเกิดเป็นกรดอะมิโน cystine เมื่อcystineเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนอินซูลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมู่ซัลฮัยดริล (sulfhydryl, -SH) ใน cysteine ประกอบด้วยอะตอม ที่มีอิเลคตรอนที่จะไปให้สารอื่น สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำหรือโมเลกุลอื่นได้แต่ไม่สามารถแตกตัวเป็นประจุได้ ร่างกายมนุษย์สามารถสังเคราะห์ cysteine ได้จาก codons UGU และ UGC

Cysteine พบได้ในอาหารที่มีโปรตีนสูงทุกชนิด ประกอบด้วย

- อาหารจากสัตว์ได้แก่ เนื้อหมู ไส้กรอก ไก่ เป็ด ไข่ นม หางนม และโยเกิร์ต
- อาหารจากพืช ได้แก่ กระเทียม หอม และบ็อกโคลี่

L-Cysteine ที่สามารถใช้เป็นอาหาร ผลิตโดยกระบวนการ Hydrolysis ขนหมู ขนนก จนกระทั่งปี ค.ศ. 2001 สามารถผลิตจากกระบวนการหมักได้โดยบริษัท Wacker Chemic Co.,Ltd. ในประเทศเยอรมัน มีประโยชน์กับร่างกายคือ

- ช่วยในการขับสารพิษที่เป็นอันตรายเป็นตัวทำลายอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดตัวหนึ่ง
- ปกป้องตับจากการดื่มแอลกอฮอลล์ การใช้ยาเสพติดและพิษจากการสูบบุหรี่
- ช่วยในการชะลอความแก่ลดการสะสมของกระและจุดด่างดำบนผิวหนัง
- ช่วยเผาผลาญไขมันและการเสริมสร้างกล้ามเนื้อ
- เนื่องจากซีสเตอีนมีความสามารถในการละลายเสมหะในหลอดลม ดังนั้นจึงได้มีการนำมารักษาอาการหลอดลมอักเสบ ถุงลมโป่งพอง วัณโรค และรักษาระบบหายใจที่ผิดปกติมีส่วนสำคัญในการทำงานของเม็ดเลือดขาวซึ่งมีหน้าที่ต่อสู้กับเชื้อโรค (www.wikipedia.com)

L-Cysteine เป็น reducing agent เนื่องจากโครงสร้างประกอบด้วยกลุ่ม sulfhydryl ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบโลหะและควบคุมให้เกิดการทำปฏิกิริยารีดอกซ์ได้น้อย ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนการเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (Zimbro และ Power, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์

3.1.1.1 จานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด ∅ 90 มิลลิเมตร

3.1.1.2 ชุดปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร ซึ่งถูกแบ่งเป็นหน่วยย่อยๆละ 0.1 มิลลิลิตร

3.1.1.3 ขวดแก้วทนความร้อนฝาเกลียว ขนาดบรรจุ 500 250 และ 100 มิลลิลิตร

3.1.1.4 หลอดแก้วฝาเกลียว พร้อมฝา ขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร และ 16x150 มิลลิลิตร

3.1.1.5 Anaerobic jar ขนาด 2.5 ลิตร

3.1.1.6 ชุดกรองสุญญากาศ

3.1.2 เครื่องมือ

3.1.2.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ	Memmert	เยอรมันนี
3.1.2.2 ตู้แช่แข็ง	-	ประเทศไทย
3.1.2.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Memmert	เยอรมันนี
3.1.2.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Tomy	ญี่ปุ่น
3.1.2.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Sartorius	เยอรมันนี
3.1.2.6 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	Sartorius	เยอรมันนี
3.1.2.7 เครื่องเขย่าไฟฟ้า	Vortex	สหรัฐอเมริกา
3.1.2.8 pH meter	TOA	ญี่ปุ่น

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.3.1 Ammonium acetate	Sigma	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.2 Ammonium iron (III) citrate	Sigma	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.3 Anaerogen	Oxoid	อังกฤษ
3.1.3.4 Anaerogen test	Merck	เยอรมันนี
3.1.3.5 D-cycloserine	Calbiochem	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.6 Fluid thioglycollate medium	Difco	สหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.7 L-cysteine hydrochloride	Sigma	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.8 Magnesiumsulfate heptaequa	Merck	เยอรมัน
3.1.3.9 Malachite green oxalate	Merck	เยอรมัน
3.1.3.10 Plate count agar	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.11 Peptone from meat	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.12 Potassium dihydrogen phosphate	Merck	เยอรมัน
3.1.3.13 Raffinose	Sigma	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.14 Safranin O	Merck	เยอรมัน
3.1.3.15 Sodium hydrogen phosphate	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
3.1.3.16 Sodium pyrosulfite	Fluka	สวิสเซอร์แลนด์
3.1.3.17 Sodium thioglycollate	Merck	เยอรมัน
3.1.3.18 Soya peptone	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.19 Tryptic soy broth	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.20 Tryptone	Difco	สหรัฐอเมริกา
3.1.3.21 Yeast extract	Difco	สหรัฐอเมริกา

3.1.3 วิธีการวิเคราะห์อ้างอิง

3.1.3.1 ISO. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-count technique. ISO 7937(E).Third edition.

3.1.3.2 Environment agency. 2004. *'Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water. –Part 6 - Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and Clostridium perfringens by membrane filtration.'*

3.1.4 เชื้ออ้างอิง

3.1.4.1 *Clostridium perfringens* type A ATCC 13124

3.1.4.2 *Escherichia coli* TISTR 887

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สถานที่ดำเนินการ

3.2.1 ห้องปฏิบัติการชีวเคมีและจุลชีววิทยา ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยาบางปู สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์น้ำ เครื่องดื่ม และภาชนะสัมผัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.3 วิธีการดำเนินการ

3.3.1 การเตรียมสปอร์ *C. perfringens*

3.3.1.1 ถ่ายเชื้ออ้างอิง *C. perfringens* ATCC 13124 จากที่เก็บในหลอด cook meat medium ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycollate medium ที่ทำการต้มไล่อากาศแล้ว จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.2 ถ่ายสารละลายเชื้ออ้างอิงจากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด AE sporulation medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.3 ทำการตรวจสอบการเกิดสปอร์โดยย้อมสี Malachite green และ Safranin O แล้วทำการตรวจสอบการเกิดสปอร์โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Strain smears) (FDA, 2001) โดยต้องมีสปอร์มากกว่า 5 spore/microscopic ดังรูปที่ภาคผนวก ง.2 แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเซลล์ที่เหลือ

3.3.1.4 ทำการนับจำนวนสปอร์โดยการเพาะเลี้ยงใน TSC agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2 การเตรียม Modified TSC medium

3.3.2.1 ส่วนประกอบ Modified TSC medium base

Tryptone	15.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	1.0	กรัม
Disodium disulfit anhydrous	1.0	กรัม
L-Cysteine hydrochloride	0.3	กรัม
Sodium thioglycolate	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 ละลายส่วนประกอบและนำไปให้ความร้อนเพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งบรรจุใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิลิตร หลอดละ 12 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.2.3 การเตรียม D-cycloserine solution

ละลาย D-cycloserine 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรองและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์หลังจากเตรียม

3.3.2.4 เติม D-cycloserine solution ลงในหลอด Modified TSC medium ในอัตราส่วน D- cycloserine solution ปริมาตรหลอดละ 120 ไมโครลิตร

3.3.3 เปรียบเทียบ TSC medium ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ TSC medium ที่เติม L-Cysteine hydrochloride และ Sodium thioglycollate (Modified TSC medium)

3.3.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามส่วนประกอบของ TSC agar แต่ไม่เติมวุ้นเพื่อให้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC แบบเหลว และแบ่งใส่หลอดละ 12 มิลลิลิตร

3.3.3.2 เจือจางสปอร์ *C. perfringens* ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จนได้ระดับความเข้มข้นที่ 1-3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร 10-30 โคโลนีต่อมิลลิลิตร 100-300 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.3.3.3 ถ่ายสารละลายเจือจางสปอร์จากข้อ 3.3.3.2 ใส่ลงใน TSC broth และ Modified TSC medium หลอดละ 1 มิลลิลิตร 30 หลอดต่อ 1 ความเข้มข้น แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20±2 ชั่วโมง โดยบ่ม TSC broth ในสภาวะไร้ออกซิเจน และ Modified TSC medium บ่มในสภาวะปกติ

3.3.3.4 ทำการนับจำนวนเชื้อ *C. perfringens* โดยการ pour plate ด้วย TSC agar แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20±2 ชั่วโมง ใน anaerobic jar และ Modified TSC medium บ่มในสภาวะปกติ

3.3.3.5 เมื่อครบเวลาทำการบ่มนำออกมาดูการเกิดตะกอนสีดำจากหลอด TSC broth, Modified TSC และนับจำนวนโคโลนีสีดำจาก TSC agar

3.3.3.6 บันทึกและทำการเปรียบผลของ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ TSC broth ที่เติม L-Cysteine hydrochloride และ Sodium thioglycollate

3.3.4 การเตรียมตัวอย่าง

3.3.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำดื่มเตรียมสปอร์ *C. perfringens* ตามข้อ 3.3.1 และถ่ายลงในน้ำตัวอย่างซึ่ง เป็นน้ำดื่มบรรจุขวดปิดสนิทที่ผลิตจำหน่ายทางการค้า แบ่งใส่ขวดแก้วฝา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 ขวด ให้มีปริมาณเชื้อ *C. perfringens* ในตัวอย่างดังนี้

3.3.4.1.1 ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเพาะเชื้อ 20 ตัวอย่าง

3.3.4.1.2 มีเชื้ออ้างอิงอยู่ในช่วง 1 – 9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ 100 มิลลิลิตร 20 ตัวอย่าง

3.3.4.1.3 มีเชื้ออ้างอิงอยู่ในช่วง 10 – 99 โคโลนีต่อมิลลิลิตรหรือ 100 มิลลิลิตร 20 ตัวอย่าง

3.3.4.1.4 มีเชื้ออ้างอิงอยู่ในช่วง 100 – 999 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ 100 มิลิลิตร 20 ตัวอย่าง

และแต่ละขวดตัวอย่างทำการการเพาะเชื้อ *E. coli* มากกว่า 2.5 x 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร หรือ 100 มิลลิลิตร โดยแต่ละตัวอย่างให้เพาะเชื้อ *E. coli* ปริมาณเท่ากัน

3.3.4.2 การเตรียมตัวอย่างน้ำแข็ง

นำน้ำจากการเตรียมตัวอย่างน้ำดื่มข้อ 3.3.4.1.2 ถึง 3.3.4.1.4 ส่วนหนึ่งไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน ก่อนทำการวิเคราะห์

3.3.5 ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็ง

3.3.5.1 การหาค่า Relative detection level

3.3.5.1.1 เตรียมน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *C. perfringens* โดยให้มีการปนเปื้อน 3 ระดับ ตามข้อ 3.3.4.1.1 ถึง 3.3.4.1.3

3.3.5.1.2 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำตามวิธีมาตรฐาน ควบคู่กับการใช้วิธีวิเคราะห์และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น โดยทำการวิเคราะห์ระดับการปนเปื้อนละ 6 ซ้ำ

3.3.5.1.3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปแปลผลและวิเคราะห์ทางสถิติ

3.3.5.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type Aเบื้องต้นในน้ำ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มในข้อ 3.3.4.1 โดยวิธี ISO7937:2004 (ISO, 2004) ตามภาคผนวก ก. ควบคู่กับการใช้วิธีวิเคราะห์ และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น โดยถ่ายตัวอย่างใส่ลงในหลอด Modified TSC medium หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด ปิดฝาให้สนิทก่อนนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง เมื่อบ่มเพาะเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว พิจารณาการเกิดตะกอนสีดำซึ่งเกิดจากการเจริญของ *C. perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.3 เมื่อตัวอย่างน้ำแข็งในข้อ 3.3.4.2 แช่แข็งครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำขวดตัวอย่างน้ำแข็งไปละลายโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 15 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำดื่มในข้อ 3.3.5.2

3.3.5.3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปแปลผลและวิเคราะห์ทางสถิติ

3.3.6 ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็ง

3.3.6.1 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มในข้อ 3.3.4.1 และตัวอย่างน้ำแข็งในข้อ 3.3.4.2 ที่ทำการละลาย โดยแช่ในอ่างควบควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที แล้ววิเคราะห์โดยวิธีของ Environment agency (2004) ตามภาคผนวก ข. ควบคู่กับการใช้วิธีวิเคราะห์และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น ดังนี้

3.3.6.1.1 เขย่าให้ตัวอย่างมีความสม่ำเสมอกันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิลิตร และมีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.3.6.1.2 พับกระดาษกรองตัวอย่างใส่ลงในหลอด Modified TSC medium ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง

3.3.6.1.3 หลังจากบ่มครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว พิจารณาการเกิดตะกอนสีดำซึ่งเกิดจากการเจริญของ *C. perfringens*

3.3.6.2 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปแปลผลทางสถิติ

3.3.7 ศึกษาการใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นแบบเข้มข้น ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐานในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

3.3.7.1 ทำการเตรียม Modified TSC medium ตามส่วนประกอบในข้อ 3.3.2 แต่ลดปริมาณน้ำกลั่นลงเหลือ 250 มิลลิลิตร แบ่งบรรจุหลอดละ 10 มิลลิลิตร และหลังจากการฆ่าเชื้อแล้วเติม D-cycloserine solution หลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.3.7.2 จัดส่ง Modified TSC medium แบบเข้มข้น ดังรูปในภาคผนวก ง.6 พร้อมทั้งวิธีการวิเคราะห์ ให้กับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์น้ำเครื่องดื่มและภาชนะสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ใช้ทำการวิเคราะห์ควบคู่กับการวิเคราะห์น้ำดื่มและน้ำแข็งปกติของห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเป็น น้ำดื่มจำนวน 20 ตัวอย่าง และน้ำแข็งจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่ง Modified TSC medium แบบเข้มข้นมีวิธีการใช้ดังนี้

3.3.7.2.1 แบ่งน้ำดื่มหรือน้ำแข็งที่ละลายแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Modified TSC medium แบบเข้มข้น 1 หลอด ปิดฝาให้สนิท และทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง

3.3.7.2.2 หลังจากบ่มครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว พิจารณาการเกิดตะกอนสีดำซึ่งเกิดจากการเจริญของ *C. perfringens*

3.4 การแปลผลการวิเคราะห์และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ISO, 2003)

3.4.1 การแปรผลการวิเคราะห์

3.4.1.1 ผลบวกเบี่ยงเบน (Positive deviation, PD) คือ ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีมาตรฐานให้ผลลบแต่วิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลบวก

3.4.1.2 ผลลบเบี่ยงเบน (Negative deviation, ND) คือ ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีมาตรฐานให้ผลบวกแต่วิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลลบ

3.4.1.3 ผลบวกจริง (Positive agreement, PA) คือ ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีมาตรฐานและวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลบวก

3.4.1.4 ผลลบจริง (Negative agreement, NA) คือ ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีมาตรฐานและวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลลบ

3.4.2 การวิเคราะห์ผล

3.4.2.1 หาค่า relative detection level

relative detection level คือปริมาณเชื้อน้อยสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้ ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่างค่าที่น้อยกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก กับค่าที่มากกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก

3.4.2.2 การหาความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) คำนวณจากสมการที่ 3.1

$$\text{Relative } \textit{sensivity} = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\,\% \qquad (3.1)$$

3.4.2.3 การหาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) คำนวณจากสมการที่ 3.2

$$\text{Relative } \textit{specificity} = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\,\% \qquad (3.2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.4 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) คำนวณจากสมการที่ 3.3

$$\text{Relative } accuracy = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\% \qquad (3.3)$$

3.4.2.5 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2) จากสมการที่ 3.4

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND} \qquad (3.4)$$

A Chi-square value $\geq$ 3.84 แสดงว่าอัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น = 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ Modified TSC medium

การเปรียบเทียบการเจริญของ *C. perfringens* ในอาหารคัดแยกเชื้อ TSC broth หรืออาหารคัดแยกเชื้อ TSC agar ที่ถูกปรับให้เป็นของเหลวด้วยการไม่เติมวุ้นเป็นส่วนประกอบตามสูตร และอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น (Modified TSC medium) หรือ TSC agar ที่ถูกปรับสูตรด้วยการไม่เติมวุ้นและเติม L-Cysteine hydrochloride และ Sodium thioglycollate ซึ่งเป็นสารก่อสภาวะรีดิวซ์ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของ *C. perfringens* โดยไม่ต้องทำการบ่มในโถควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน และใช้ซองดูดซับออกซิเจนซึ่งมีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเมื่อมีการเจริญของเชื้อ *C. perfringens* จะเกิดตะกอนสีดำขึ้นในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงจำนวนหลอดอาหารคัดแยกเชื้อ Modified TSC medium และ TSC broth ที่มีการเจริญของ *C. perfringens* โดยทดสอบช่วงความเข้มข้นละ 30 หลอด จะเห็นได้ว่า *C. perfringens* สามารถเจริญได้ใน Modified TSC medium และ TSC broth ในช่วงความเข้มข้น 100 – 300 โคโลนี/ 1 มิลลิลิตร ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน 100% แต่ในช่วง 1- 3 โคโลนี/ 1มิลลิลิตร และ 10 – 30 โคโลนี/1 มิลลิลิตร *C. perfringens* เจริญได้ใกล้เคียงกัน คือสอดคล้องกันร้อยละ 112.50 และ ร้อยละ 93.33 ตามลำดับ จึงถือได้ว่า *C. perfringens* สามารถเจริญได้ใน Modified TSC medium และ TSC broth เทียบเท่ากัน เหมาะสมที่จะดัดแปลงเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็งต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ Modified TSC medium

ความเข้มข้น *C. perfringens* (โคโลนี/1 มิลลิลิตร)	จำนวนหลอด TSC broth บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ให้ผลบวก		จำนวนหลอด Modified TSC medium ที่ให้ผลบวก	
	หลอด	ร้อยละ	หลอด	ร้อยละ
1-3	8/30	26.66	9/30	30.00
10-30	30/30	100.00	28/30	93.33
100-300	30/30	100.00	30/30	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสูตรอาหารคัดแยกเชื้อ Modified TSC medium ที่ได้นำมาปรับใช้วิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง ทั้งในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อมิลลิลิตรและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข 7937 ฉบับปี ค.ศ. 2004 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้ pour plate technique และปรับใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 100 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคการกรองและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบโดยเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ Environment agency (2004)

4.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

เมื่อนำ Modified TSC medium มาปรับใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 1 มิลลิลิตร โดยการใส่ตัวอย่างน้ำดื่มหรือน้ำแข็งที่ละลายแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด Modified TSC medium ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง แล้วนำมาพิจารณาการเกิดตะกอนสีดำ เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ซึ่งใช้วิธีการ pour plate ด้วย TSC agar เป็นอาหารคัดแยกเชื้อ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง เช่นกันพบว่า *C. perfringens* จะเจริญเป็นโคโลนีสีดำ

ในการหาปริมาณเชื้อน้อยสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้ (Relative detection level) โดยทำการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ด้วยวิธีการของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้นความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ (ตารางที่ 4.2) หาค่าที่อยู่ระหว่างค่าที่น้อยกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก กับค่าที่มากกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก จากตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ใกล้เคียงร้อยละ 50 คือ ช่วงการปนเปื้อน 1- 5 และ 5 – 10 โคโลนี/มิลลิลิตร ค่าที่อยู่ระหว่างค่าที่น้อยกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก กับค่าที่มากกว่าปริมาณการปนเปื้อนที่วิธีวิเคราะห์ตรวจพบได้ร้อยละ 50 ของวิธีมาตรฐานและวิธีทางเลือก คือ >1 และ <5 โคโลนี/มิลลิลิตร ดังนั้น ปริมาณเชื้อน้อยสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้อยู่ในช่วง 1 ถึง 5 โคโลนี/มิลลิลิตร

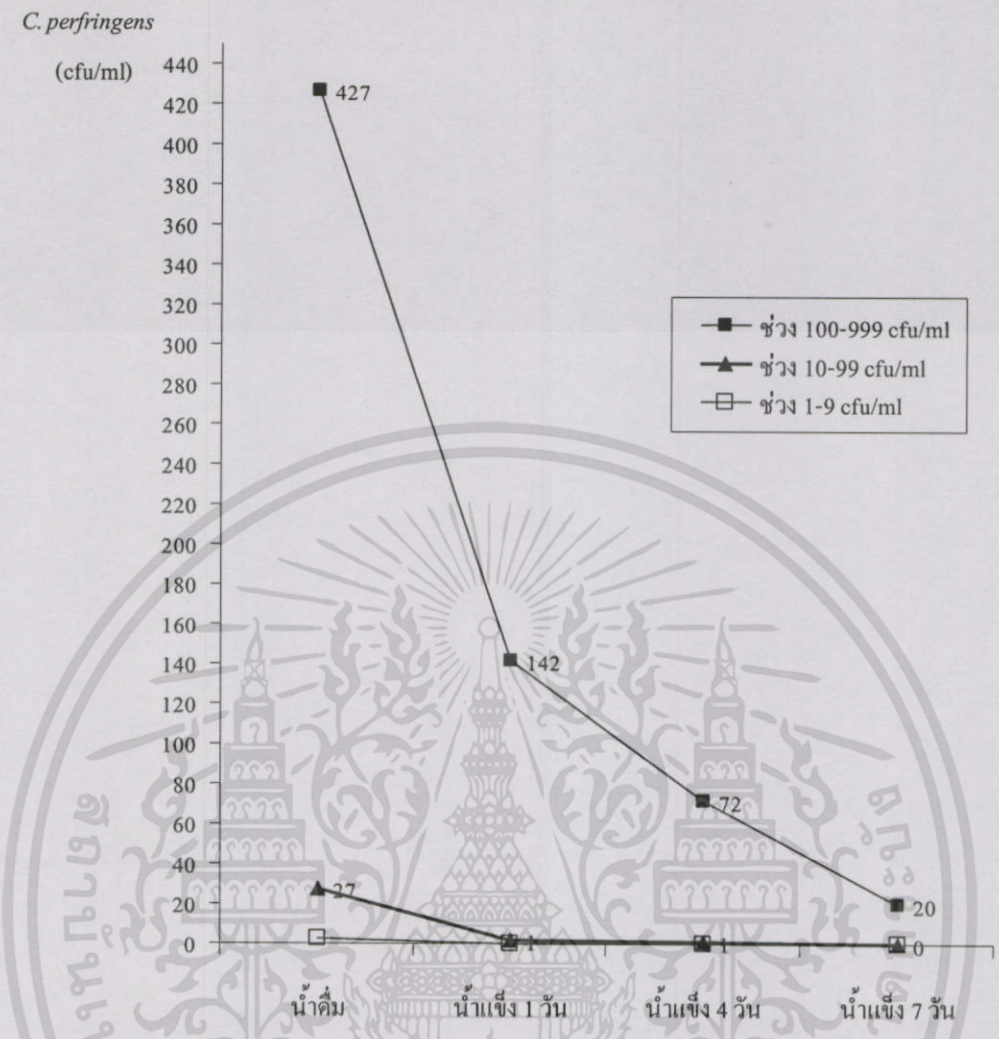
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้น ซึ่งใช้ Modified TSC medium

C. perfringens (โคโลนี/1 มิลลิลิตร)	ISO7937(2004), TSC agar	Alternative method, Modified TSC medium
	จานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
0	0/6	0/6
1-5	6/6	4/6
6-10	6/6	5/6
11-100	6/6	6/6
>150	6/6	6/6

จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่ม ทดสอบในตัวอย่างที่ถูกเพาะสปอร์ *C. perfringens* รหัส ATCC13124 ซึ่งเป็น type A ทั้งหมด 4 ระดับความเข้มข้น คือ ไม่มี *C. perfringens* 1- 9 โคโลนี/ 1 มิลลิลิตร 10 – 99 โคโลนี/ 1 มิลลิลิตร และ 100 – 999 โคโลนี/ 1 มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นจะมีการเพาะ *E. coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์พื้นฐานที่พบมีการปนเปื้อนในน้ำที่ไม่สะอาด ปริมาณ >2.5 x 10^3 โคโลนี/100 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มที่ถูกเพาะเชื้อด้วยวิธีการของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้นความเข้มข้นละ 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แสดงผลในตารางที่ 4.3 และเตรียมตัวอย่างน้ำแข็งโดยการนำน้ำดื่มที่มีการเพาะเชื้อทั้ง 4 ความเข้มข้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส แบ่งเป็นเวลา 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน ความเข้มข้นละ 20 ตัวอย่างต่อ 1 ระยะเวลาการแช่แข็ง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้วด้วยวิธีการของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แสดงผลในตารางที่ 4.4 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ *C. perfringens* แสดงในภาคผนวก ค. แต่เนื่องจากตัวอย่างเป็นน้ำดื่มคุณภาพดี ไม่มีสิ่งแปลกปลอม จึงไม่สิ่งห่อหุ้มเซลล์ หรือสปอร์เพื่อให้มีความคงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เมื่อเพาะสปอร์ลงน้ำดื่มแล้วนำไปแช่แข็งซึ่งเป็นการแช่แข็งแบบช้าๆ ทำให้โครงสร้างของเซลล์หรือสปอร์ถูกทำลาย เนื่องจากขนาดของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่และลักษณะโครงสร้างของผลึก หรือที่เรียกว่า lethal effects และสปอร์ที่เหลืออยู่เป็นสปอร์ที่บาดเจ็บจากการแช่แข็ง (freeze-injured) หรือเซลล์ที่มีการเมตบอลิซึมผิดปกติ (metabolically injured) ทำให้ไม่พบการเจริญเมื่อทำการวิเคราะห์จำนวน หรือที่เรียกว่า sublethal effects (Frazier และ Westhoff, 1988) ปริมาณ *C. perfringens* ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างน้ำแข็งจึงลดลงอย่างรวดเร็ว ดังแสดงใน รูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การลดลงของ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าจำนวน *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำดื่มที่นำไปแช่แข็งลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราส่วนในการลดลงของจำนวน *C. perfringens* ในน้ำแข็งจากตัวอย่างน้ำดื่มที่มีการเพาะ *C. perfringens* ช่วง 1- 9 โคโลนี/มิลลิลิตร เมื่อผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน เฉลี่ยเป็นร้อยละ 90.26 87.50 และ 100 ตามลำดับ จากน้ำดื่มที่มีการเพาะ *C. perfringens* ช่วง 10 – 99 โคโลนี/มิลลิลิตร เมื่อผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน เฉลี่ยเป็นร้อยละ 94.76 96.42 และ 100 ตามลำดับ และจากน้ำดื่มที่มีการเพาะ *C. perfringens* ช่วง 100 - 999 โคโลนี/มิลลิลิตร เมื่อผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน เฉลี่ยเป็นร้อยละ 69.12 71.41 และ 91.32 ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำดื่มต่อ 1 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ		ช่วง 1- 9 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 10-99 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 100-999 โคโลนี/มิลลิลิตร	
	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative
1	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	+	+
9	-	-	+	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+	+	+
13	-	-	+	+	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	+	+	+
15	-	-	+	+	+	+	+	+
16	-	-	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	+	+	+	+
18	-	-	+	+	+	+	+	+
19	-	-	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 1 วัน ต่อ 1 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ		ช่วง 1- 9 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 10-99 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 100-999 โคโลนี/มิลลิลิตร	
	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative
1	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	+	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+
9	-	-	-	-	+	-	+	+
10	-	-	-	-	-	+	+	+
11	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+	+	+
13	-	-	+	+	+	+	+	+
14	-	-	+	+	+	-	+	+
15	-	-	+	-	+	+	+	+
16	-	-	+	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	+	+	+	+
18	-	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งผ่านการแช่แข็ง 4 วันต่อ 1 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ		ช่วง 1- 9 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 10-99 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 100-999 โคโลนี/มิลลิลิตร	
	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative
1	-	-	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	-	-	+	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+
13	-	-	-	-	-	-	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	+
15	-	-	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	-	-	+	+
17	-	-	-	-	+	-	+	+
18	-	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	-	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน ต่อ 1 มิลลิลิตร

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ		ช่วง 1- 9 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 10-99 โคโลนี/มิลลิลิตร		ช่วง 100-999 โคโลนี/มิลลิลิตร	
	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative	ISO 7937	Alternative
1	-	-	-	-	-	-	+	+
2	-	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	+
9	-	-	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	+	+
11	-	-	-	-	-	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	+
13	-	-	-	-	-	-	+	+
14	-	-	-	-	-	-	+	+
15	-	-	-	-	-	-	+	+
16	-	-	-	-	-	-	+	+
17	-	-	-	-	-	-	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	-	-	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการผลทดลองในตารางที่ 4.3 ถึง 4.6 นำผลที่จากการวิเคราะห์โดยวิธี ISO 7937 และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเป็น ผลบวกเบี่ยงเบนหรือผลลบเบี่ยงเบน หมายถึง ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีที่ดัดแปลงขึ้นเบี่ยงเบนไปจากผลของ ISO7937 ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน และผลบวกจริง หรือผลลบจริง หมายถึง ผลจากการวิเคราะห์ที่วิธีมาตรฐานและวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการทดสอบของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 กับวิธีที่ดัดแปลงขึ้น

	จำนวนตัวอย่าง			
	น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
ผลบวกจริง	54	41	28	20
ผลบวกเบี่ยงเบน	0	3	0	0
ผลลบจริง	24	33	50	60
ผลลบเบี่ยงเบน	2	3	2	0
รวม	80	80	80	80

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4.7 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็งอัตราส่วนระหว่างวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05 ยกเว้นในตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน ที่ไม่สามารถคำนวณค่า Chi-square value ได้ (Chi-square value ของ น้ำดื่มและน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน และ 4 วัน เท่ากับ 0.5 0.17 0.5 ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามและคำนวณร้อยละความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ ISO7937 ปี 2004 ได้ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีเทียบกับ ISO 7937:2004

	น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
ความไว (%)	96.0	93.0	93.0	100.0
ความจำเพาะ (%)	100.0	91.0	100.0	100.0
ความถูกต้อง (%)	97.5	92.5	97.5	100.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ วิธีวิเคราะห์วิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้นวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็งได้เทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์ ISO 7937 สามารถนำสูตรอาหารคัดแยกเชื้อ Modified TSC medium ไปใช้ในการวิเคราะห์น้ำและน้ำแข็ง และเหมาะสมที่จะดัดแปลงเพื่อให้นำไปใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* ในตัวอย่างอาหารต่อไป

4.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

วิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ซึ่งนิยมใช้ทั่วไปกับตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำใช้และน้ำจากแหล่งธรรมชาติ วิธีการวิเคราะห์ใช้การกรองน้ำตัวอย่างน้ำดื่มหรือน้ำแข็งที่ละลายแล้ว 100 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษกรองที่ได้ไปเพาะหา *C. perfringens* ด้วยอาหารคัดแยกเชื้อ TSC agar ซึ่งต้องควบคุมสภาวะการบ่มเพาะให้เป็นสภาวะไร้ออกซิเจน ด้วยการบ่มในโถควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจนและซองดูดซับออกซิเจนที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง แล้วพิจารณาการเจริญของ *C. perfringens* เป็นโคโลนีสีดำ เปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้นโดยการกรองตัวอย่างน้ำดื่มหรือน้ำแข็งที่ละลายแล้ว 100 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency และพับกระดาษกรองที่ได้ใส่ลงในหลอด Modified TSC medium บ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องควบคุมสภาวะออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 22 ชั่วโมง แล้วพิจารณาการเกิดตะกอนสีดำภายในหลอด Modified TSC medium และบนกระดาษกรอง

ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นด้วยทั้งสองวิธี พบว่า ปริมาณเชื้อน้อยสุดที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้ หรือ Relative detection level (ตารางที่ 4.9) อยู่ในช่วง 20 โคโลนี/100 มิลลิลิตร ถึง 30 โคโลนี/100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.9 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Environment agency (2004) ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

C. perfringens (cfu/100 mL)	Environment agency, TSC agar	Alternative method, Modified TSC medium
	จานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
1- 10	4/6	0/6
11 – 20	6/6	2/6
21 – 30	6/6	5/6
31 – 40	6/6	6/6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากค่า Relative detection level ที่ได้หากนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการเพาะ *C. perfringens* ลงในตัวอย่างเพื่อจะทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น ตัวอย่างน้ำดื่มที่นำมาวิเคราะห์ก็จะมีการปนเปื้อน *C. perfringens* สูง ซึ่งในน้ำดื่มที่มีจำหน่ายทั่วไปมีรายงานการพบ *C. perfringens* น้อย ดังนั้น ตัวอย่างจึงทำการเพาะสปอร์ *C. perfringens* รหัส ATCC13124 ซึ่งเป็น type A ทั้งหมด 4 ระดับลงในตัวอย่างน้ำดื่มคือระดับความเข้มข้น 1-9 โคโลนี/100 มิลลิลิตร 10-99 โคโลนี/100 มิลลิลิตร 100 – 999 โคโลนี/100 มิลลิลิตร และไม่มีการเพาะเชื้อ *C. perfringens* แต่ละความเข้มข้นจะมีการเพาะ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์พื้นฐานที่พบมีการปนเปื้อนในน้ำที่ไม่สะอาดปริมาณ >2.5 x 10^2 โคโลนี/100 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มที่ถูกเพาะเชื้อด้วยวิธีการของ Environment agency ปี 2004 ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้นความเข้มข้นละ 20 ตัวอย่าง และเตรียมตัวอย่างน้ำแข็งโดยการนำน้ำดื่มที่มีการเพาะสปอร์ *C. perfringens* ทั้ง 4 ความเข้มข้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน, 4 วัน และ 7 วัน แล้วนำออกมาละลายด้วยการแช่ในน้ำเพื่อให้น้ำแข็งละลายหมดภายในเวลา 30 นาที แล้วทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายด้วยวิธีการของ Environment agency ปี 2004 ควบคู่กับวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น แสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.10 ถึง 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่ม ต่อ 100 มิลลิลิตร

ลำดับที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ไม่มีการเพาะเชื้อ	Environment agency	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 1- 9 คโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 10-99 คโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Alternative	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ช่วง 100-999 คโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Alternative	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำแข็ง 1 วัน ต่อ 100 มิลลิลิตร

ลำดับที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ไม่มีการเพาะเชื้อ	Environment agency	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 1- 9 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 10-99 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Alternative	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
ช่วง 100-999 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Alternative	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำแข็ง 4 วัน ต่อ 100 มิลลิลิตร

ลำดับที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ไม่มีการเพาะเชื้อ	Environment agency	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 1- 9 โลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 10-99 โลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 100-999 โลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
	Alternative	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นใน น้ำแข็ง 7 วัน ต่อ 100 มิลลิลิตร

ลำดับที่		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ไม่มีการเพาะเชื้อ	Environment agency	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 1- 9 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 10-99 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alternative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ช่วง 100-999 โคโลนี/100 มิลลิลิตร	Environment agency	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Alternative	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.10 ถึง 4.13 ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์โดยวิธีของ Environment agency (2004) และวิธีวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น แสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบระหว่างวิธีทดสอบของ Environment agency (2004) กับวิธีที่ดัดแปลงขึ้น

	จำนวนตัวอย่าง			
	น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
ผลบวกจริง	38	30	2	2
ผลบวกเบี่ยงเบน	0	0	1	0
ผลลบจริง	25	36	70	74
ผลลบเบี่ยงเบน	17	14	7	4
รวม	80	80	80	80

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4.14 คำนวณร้อยละความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ได้ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีเทียบกับ Enviroment agency (2004)

	ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (%)			
	น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
ความไว	96.09	21.90	22.20	33.33
ความจำเพาะ	100.00	100.00	98.60	100.0
ความถูกต้อง	78.75	57.50	90.00	95.00

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 4.14 และ 4.15 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency (2004) ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน อัตราส่วนระหว่างวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05 (Chi-square value = 15.05 และ 32 ตามลำดับ) ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแช่แข็ง 4 วัน และ 7 วัน พบว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05 โดย Chi-square value เท่ากับ 3.12 และ 2.25 ตามลำดับ แต่จากค่าร้อยละความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ดัดแปลงขึ้นไม่เหมาะสมที่จะทำไปใช้ในการวิเคราะห์

4.4 การใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นแบบเข้มข้น ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐานในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

จากการปรับความเข้นข้นของ Modified TSC medium ให้เข้มข้นขึ้น เพื่อให้เหมาะสมในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้น ในตัวอย่างน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 100 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องผ่านการกรอง การศึกษาเปรียบเทียบการใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นแบบเข้มข้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์มาตรฐานในตัวอย่างน้ำและน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ โดยเตรียม Modified TSC medium เข้มข้นเป็น 4 เท่า ปริมาตรหลอดละ 25 มิลลิลิตร จัดส่งให้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์น้ำเครื่องดื่มและภาชนะสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ใช้ทำการวิเคราะห์โดยการเติมลงในน้ำดื่มหรือน้ำแข็งละลายแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ควบคู่กับการวิเคราะห์น้ำดื่มและน้ำแข็งปกติ พบว่า ผลวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบ *C. perfringens* ในน้ำแข็งมากกว่าวิธีที่ดัดแปลงขึ้น 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.16) กล่าวคือ วิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเชื้อ 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.5 ขณะที่วิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น พบเชื้อ 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25 ดังนั้น วิธีการที่ดัดแปลงขึ้นโดยใช้ Modified TSC medium เข้มข้น 4 เท่า มีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ได้จริงในการวิเคราะห์ หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ *C. perfringens* ตัวอย่างน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

ตัวอย่างที่	ผลการวิเคราะห์ *C. perfringens* (/100 มิลลิลิตร)		จุลินทรีย์อื่นๆที่พบ
	วิธีมาตรฐาน	วิธีที่ดัดแปลงขึ้น	
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	พบ	พบ	ไม่พบ
8	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
11	พบ	พบ	Coliforms, *E .coli*
12	พบ	พบ	ไม่พบ
13	พบ	พบ	ไม่พบ
14	พบ	พบ	ไม่พบ
15	พบ	พบ	ไม่พบ
16	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
17	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
18	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
19	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
20	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ผลการวิเคราะห์ *C. perfringens* (/100 มิลลิลิตร)		จุลินทรีย์อื่นๆที่พบ
	วิธีมาตรฐาน	วิธีที่ดัดแปลงขึ้น	
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
2	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
4	ไม่พบ	ไม่พบ	Coliforms
5	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
8	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
9	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
11	พบ	พบ	ไม่พบ
12	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
13	พบ	พบ	Coliforms, *E. coli*, *Salmonella* spp.
14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
15	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
16	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
17	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
18	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
19	พบ	พบ	ไม่พบ
20	พบ	พบ	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการดัดแปลงอาหารคัดแยกเชื้อโดยการเติม L-Cysteine hydrochloride และ Sodium thioglycollate ซึ่งเป็นสารก่อสภาวะรีดิวซ์ ลงใน TSC broth เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนขึ้นในหลอดอาหารคัดแยกเชื้อ มีความเหมาะสมกับการเจริญของ *C. perfringens* เช่นเดียวกับ TSC broth ที่บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar + anerogen pack) เมื่อนำสูตรอาหารคัดแยกเชื้อที่ได้ (Modified TSC medium) มาปรับใช้วิเคราะห์หา *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็ง Modified TSC medium สามารถปรับใช้ในการวิเคราะห์ *C. perfringens* ต่อมิลลิลิตร ทั้งในน้ำดื่ม น้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน และ 4 วัน เทียบได้กับวิธีการวิเคราะห์ของ ISO 7937 (2004) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้ pour plate technique ในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน ไม่สามารถคำนวณหานัยสำคัญของความแตกต่างได้ การปรับใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยใช้เทคนิคการกรองทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ของ Environment agency (2004) นั้น จากค่าร้อยละความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ดัดแปลงขึ้นไม่เหมาะสมที่จะทำไปใช้ในการวิเคราะห์

การปรับอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นให้เข้มข้นเป็น 4 เท่า และทำการวิเคราะห์ควบคู่กับการวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า ผลวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบ *C. perfringens* ในน้ำแข็งมากกว่าวิธีที่ดัดแปลงขึ้น 1 ตัวอย่าง กล่าวคือ วิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเชื้อ 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.5 ขณะที่วิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงขึ้น พบเชื้อ 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25 แสดงให้เห็นว่า วิธีการที่ดัดแปลงขึ้นโดยใช้ Modified TSC medium เข้มข้น 4 เท่า มีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ได้จริงในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

การนำสูตรอาหารคัดแยกเชื้อที่พัฒนาขึ้น (Modified TSC medium) มาปรับใช้วิเคราะห์หา *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อมิลลิลิตร และวิธีการวิเคราะห์ของ ISO 7937 (2004) ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens*น้ำดื่มและน้ำแข็ง ทำการปรับใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเพื่อวิเคราะห์หา *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อมิลลิลิตร เป็นการพิสูจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น และเป็นแนวทางที่จะทำการปรับใช้อาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเพื่อวิเคราะห์หา *C. perfringens* ในอาหารต่อไป

การปรับอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นให้เข้มข้นเป็น 4 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร วิเคราะห์หา *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อทำการเติมอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นลงในตัวอย่างน้ำดื่มหรือน้ำแข็ง 100 มิลลิลิตรแล้ว ความเข้มข้นของอาหารคัดแยกเชื้อที่พัฒนาขึ้นเจือจางกว่าสูตรอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้น ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* ในน้ำดื่มและน้ำแข็งต่อ 100 มิลลิลิตร ควรการปรับอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นให้เข้มข้นเป็น 5 เท่า ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นันทนา อรุณฤกษ์. 2538. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรปส์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพ.

Akhtar, S., Paredes-Sabja, D., Torres, J.A..2009. Strategy to Inactivate *Clostridium perfringens* Spore in Meat Products. Journal Food Microbiology. [Online]. Available: http://www.elsevier.com/ locate.fm. Acc. 23/5/52.

Araujo, M., Sueiro, R. A., Gómez , M. J. and Garrido, M. J..2004. "Enumeration of *Clostridium perfringens* Spores in Groundwater Samples: Comparison of Six Culture Media" **Journal of Microbiological Method**. vol.57. pp.175-180.

Bergey, D.H. and Holt, J.G. editor. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Williams&Wilkins. Baltimore. Maryland. USA.

Borriello, S.P.,Murray, D.R. and Funke, G. editor .2005. **Microbiology & Microbial Infections**. Vol.1. (Bacteriology). Hodder Arnold. London. England.

Bisson, J.W. and Cabellii, V.J.. 1979. "Membrane Filter Enumeration Method for *Clostridium perfringens*." **Journal Applied and Environmental Microbiology**. vol.62(7). pp.55- 56.

Downes, F.P. and Ito, K. editor. 2001. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington. American Public Health Association. USA.

Doyle, M.P. editor.1995. **Food Born Bacterial Pathogens**. University of Massachusetts. Massachusetts. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Environment agency. 2004. 'Standing Committee of Analysts, The Microbiology of Drinking Water. –Part 6 - Methods for the isolation and enumeration of sulphite-reducing clostridia and Clostridium perfringens by membrane filtration.'

FDA. 2001. *Clostridium perfringens*. Bacteriological Analytical Manual online. [Online]. Available: www. BAM online.gov/*Clostridium perfringens*.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.. 1988. Preservation by Use of High Temperatures. Food Microbiology. 4 th edition. McGraw-Hill Book Company. Singapore.

Harmon, S.M. and Kautter, D.A..1987. Enumeration of *Clostridium perfringens* Spore in Human Feces: Comparaison of Four Culture Media. [Online]. Available: http://www.pubmed.gov.

ISO.2003. Microbiology of food and feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. ISO16140:2003(E). 1st edn. Switzerland.

_____. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony-count technique. ISO 7937: 2004(E). 3rd edn. Switzerland.

Jong, A.E., Eijhusen, GP., Brouwer-Post, EJ., Grand, M., Johansson, T., Kärkkäinen, T., Marugg, J., Veld, P.H., Warmerdam, F.H., Wörner, G., Zicavo, A., Rombouts, F.M., Beumer, R.R..2003. Comparison of Media for Enumeration of *Clostridiun perfringens* from Foods. [Online]. Available: http://www.pubmed.gov.

Jose, S., Labbe, R. and Rodriguez, M. A.. 1992. "Sporulation and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens*Type A at 37 and 43°C." **Journal Applied and Environmental Microbiology**. vol 37(1). pp.1411-1414.

Lederberg, J. editor. 2000. **Encyclopedia of Microbiology**. Academic Press. San Diego. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lenntech Water Treatment & Air Purification Holding. 1998.'Microbiological parameter'. WHO/EU drinking water standards comparative table. [Online]. Available : http://www. Google.com/drinking standards/EU drinking standard.

Li, J. and McClane, B.A.. 2006. "Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid – Borne Enterotoxin Gene." **Journal Applied and Environmental Microbiology**. vol 72. pp.4561- 4568.

Long, S., Jones, D.T. and Woods, D.R. 1983. "Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a Defined Medium." **Journal Applied and Environmental Microbiology**. vol 45(4). pp.1389-1393.

Orsburn, B., Melville, S. B. and Popham, D.L. 2008."Factors Contributing to Heat Resistance of *Clostridium perfringens* Endospores." **Journal Applied and Environmental Microbiology**. vol. 74. pp.3328-3335.

Paredes-Sabja , D., Raju, D., Torres, J.A. and Sarker, T.M.. 2007. 'Role of Small, Acid-Soluble Spore Proteins in The Resistance of *Clostridium perfringens* Spore to Chemicals'. [Online]. Available: http://www.pubmed.gov./International Journal of Food Microbiology.

Philip, W. A. and Christopher, P. S. 2001.'Rapid Confirmation of *Clostridium perfringens* by Using Chromogenic and Fluorogenic Substrates. [Online]. Available : http://www.PubMed Central/Journal List/Applied and Environmental Microbiology.

Sacks, L.E. and Thompson, P.A.. 1978. "Clear, Defined Medium for the Sporulation of *Clostridium perfringens*." **Journal Applied and environmental microbiology**. vol.35. pp. 405-410.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S. and Hayashi, H.. 2001. 'Complete Genome Sequence of *Clostridium perfringens*, an Anaerobic flesh-eater.' [Online]. Available : http://www.pnas.org.html.

Tansuphasiri, U.., Matra, W. and Sangsuk, L.. 2005. "Antimicrobial Resistance Among *Clostridium perfringens* Isolated from Various Sources in Thailand.' **Journal Southeast Asian Journal Medicine Public Health**. vol.36. No.4. pp.954-961.

Tom, P.D. 2007. *Clostridium perfringens*. [Online]. Available : http://www. Seafood network information center.html./Sea Grant Extension Program/Food Science and Technology Department/University of California.

Varga, J.J., Therit, B. and Melville, S.B.. 2008. "Type IV pili and the CcpA protein are needed for miximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen Clostridium perfringens ." **Journal American society for microbiology**. Vol.76.

www. Wikipedia.com. [Online]. Available : http:// www. Wikipedia.com./sodium thioglycolate.

_____ [Online]. Available : http:// www. Wikipedia.com./L-cysteine.

Zimbro M.J. and Power D.A. editor. 2003. **Difco & BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media**. Marryland. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์หาจำนวน *C. perfringens* โดย Pour Plate Technique. (ISO, 2004)

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1. ตู้บ่มเพาะเชื้อ ช่วงใช้งานอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส

1.2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ช่วงการใช้งานอุณหภูมิ 45 ±1 องศาเซลเซียส และ 46±0.5 องศาเซลเซียส

1.3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ช่วงใช้งานอุณหภูมิ 121 ถึง 123 องศาเซลเซียส

1.4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 3 ตำแหน่ง

1.5. เครื่องเขย่าไฟฟ้า (Vortex mixer)

1.6. Anaerobic jar พร้อม Gas pack

1.7. จานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด ∅ 90 มิลลิเมตร

1.8. ชุดปิเปตพลาสติกปราศจากเชื้อ ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร ซึ่งถูกแบ่งเป็นหน่วยย่อยละ 0.1 มล.

1.9. ขวดแก้วทนความร้อนฝาเกลียว ขนาดบรรจุ 500 และ250 มิลลิลิตร

1.10. หลอดแก้วฝาเกลียว พร้อมฝา ขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร และ 16x150 มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1. Presumptive test

2.1.1. Phosphate Buffer

2.1.2. Egg-yolk-free TSC agar หรือ Sulfite-cycloserine agar

2.1.3. D-Cycloserine solution

2.2. Confirmation test

2.2.1. Fluid thioglycollate medium

2.2.2. Lactose sulfite medium (Base medium)

2.2.3. Disodium disulfite solution

2.2.4. Ammonium iron (III) citrate solution

3. การเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1. Tryptose - Sulfite-cycloserine medium

3.1.1. TSC agar base

3.1.1.1. ละลายผง TSC agarในน้ำกลั่นตามสัดส่วนที่ผู้ผลิตกำหนดแล้วนำไปต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.1.2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.1.1.3. เก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 1 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 2 สัปดาห์หลังจากเตรียมแล้ว

3.1.2. D-cycloserine solution

3.1.2.1. ละลาย D-cycloserine 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง

3.1.2.2. เก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 1 ถึง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์หลังจากเตรียม

3.1.3. Complete medium

ก่อนทำการใช้ TSC agarเติม D-cycloserine solution ลงใน TSC agar base ที่หลอมละลายแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 44-47 องศาเซลเซียส ในอัตรส่วน D-cycloserine solution 1 มิลลิลิตร ต่อ TSC agar base 100 มิลลิลิตร

3.1.4. Fluid thioglycollate medium

3.1.4.1. ละลายผง Fluid thioglycollate medium ในน้ำกลั่นตามสัดส่วนที่ผู้ผลิตกำหนดแล้วนำไปต้มให้อาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.1.4.2. แบ่งใส่ฝาเกลียวหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และต้องทำการต้มไล่อากาศก่อนนำไปใช้

3.1.5. Lactose sulfite medium (LS)

3.1.5.1. Base medium

3.1.5.1.1. ส่วนประกอบ

Enzymatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Sodium chloride	2.5 g
Lactose	10 g
L-Cysteine hydrochloride	0.3 g

3.1.5.2. ละลายสารประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ หลอดละ 8 มิลลิลิตร

- sterilization ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 ±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.6 Disodium disulfite solution

- ละลาย Disodium disulfite anhydrous 1.2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง

- สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

3.1.7 Ammonium iron (III) citrate solution

- ละลาย Ammonium iron (III) citrate 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อโดยการกรอง

- สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

3.1.8 Complete medium

- เติม Disodium disulfite solution 0.5 มิลลิลิตร และ Ammonium iron (III) citrate solution 0.5 มิลลิลิตร ลงใน base medium

- สารละลายสามารถใช้ได้ไม่เกิน 1 วัน

4. วิธีการทดสอบ

4.1 Presumptive test

4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

-กรณีตัวอย่างเป็นของแข็ง

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติม Maximal- Recovery Diluent 225.0 มิลลิลิตร นำไปตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที จะได้ความเข้มข้นของตัวอย่าง 0.1กรัม/มิลลิลิตร

-กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว

ตัวอย่างใส่ลงผสมกันในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าอย่างน้อย 50 ครั้ง ดูดตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุง Stomacher เติม Maximal- Recovery Diluent 225.0 มิลลิลิตร นำไปตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 1 นาที จะได้ความเข้มข้นของตัวอย่าง0.1 กรัม/มิลลิลิตร

- เตรียมความเข้มข้นต่อไป (0.01 กรัม/มิลลิลิตร) โดยการดูดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มี Maximal-Recovery Diluent อยู่ 9.0 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าด้วย Vortex ให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอทั่วหลอด จะตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.01 กรัม/มิลลิลิตร ทำซ้ำต่อไปจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การเพาะเชื้อเพื่อดูลักษณะโคโลนี

- ดูดตัวอย่างความเข้มข้นละ 2.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1.0 มิลลิลิตร

- เท TSC agar ที่ถูกเก็บใน water bath อุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส ลงไปประมาณ 10-15 มิลลิลิตร แล้วทำการวนจานเพาะเชื้อจนสารละลายตัวอย่างกระจายทั่ว ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณภูมิห้อง แล้วเททับด้วย SC agar อีก 10 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง

- เมื่อ TSC agar แข็งตัวแล้วกลับจานเพาะเชื้อใส่ลงใน Anaerobic jar ที่มีตัวทำให้เกิดสภาวะปราศจากออกซิเจนพร้อมทั้งแผ่นทดสอบสภาพปราศจากออกซิเจน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 $\pm$2 ชั่วโมง

- เมื่อบ่มครบเวลาที่กำหนด นำออกจากตู้บ่ม สังเกตที่แผ่นทดสอบจะต้องแสดงสภาวะว่าปราศจากออกซิเจน นับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำจากจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีดำน้อยกว่า 150 โคโลนี แล้วจดบันทึกจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละความเข้มข้นลงในแบบฟอร์มการบันทึกผลการวิเคราะห์

4.1.3 การเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบยืนยันผล (Confirmation)

เลือกโคโลนีที่มีสีดำ 5 โคโลนี หรือต่ำกว่าในกรณีที่มีเชื้อขึ้นต่ำกว่า 5 โคโลนี ใส่ลงใน Fluid thioglycollate medium หลอดละ 1 โคโลนี แล้วนำไปบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

4.2 Confirmed test

- หลังจากบ่มครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำมาใส่ลงใน LS medium 5 หยด โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อและทำอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

- หลังจากบ่มครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว พิจารณาผลการทดสอบดังนี้

คุณสมบัติ	ลักษณะ	*C .perfringens*
การสร้างแก๊สจากการย่อย	มีแก๊สในหลอด Durham มากกว่า	+
Lactose	¼ ของหลอด	
การสร้างตะกอน iron sulfite	มีตะกอนสีดำ	+

-สำหรับหลอด LS medium ที่มีตะกอนสีดำแต่มีแก๊สไม่ถึง ¼ ของหลอด Durham ให้ถ่ายลง LS medium หลอดใหม่5 หยด โดยใช้ปิเปตปราศจากเชื้อและทำอย่างรวดเร็ว แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาพิจารณาผลใหม่อีกครั้ง

- บันทึกผลการที่ได้ลงในแบบฟอร์มบันทึกผลการทดสอบ

5. การคำนวณผล

สูตร $$N = \frac{p}{n} \times \sum C \times d$$

N = จำนวนโคโลนี ต่อ มิลลิลิตร หรือ กรัม ของตัวอย่าง

$\sum C$ = ผลรวมของโคโลนีทั้งหมดทุกจานเพาะเชื้อที่นับได้

p = จำนวนโคโลนีที่ทดสอบยืนยันผลให้ผลบวก

n = จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เลือกมาทดสอบยืนยันผล

d = ระดับความเจือจางที่ทำการนับโคโลนีได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

The Microbiology of Drinking Water (2004)

Methods for the enumeration of *Clostridium perfringens* by membrane filtration

1. Introduction

Tests for *Clostridium perfringens* play only a subsidiary role in water examination. The organisms form spores which are resistant to environmental stress and can persist in the environment for some time. *Clostridium perfringens* is associated with faecal contamination. If found at a time when other faecal indicator organisms are no longer detectable, the organism may indicate remote or intermittent pollution. The monitoring of *Clostridium perfringens* during water treatment processes may be useful in assessing the performance of such treatment. The significance of *Clostridium perfringens* in water treatment and supply are described elsewhere in this series.

2. Scope

The method is suitable for the examination of drinking waters including samples from all stages of treatment and distribution, and those source waters of moderate turbidity. Users wishing to employ this method should verify its performance under their own laboratory conditions.

3. Definitions

Clostridium perfringens is a Gram-positive anaerobic spore-forming rod, which in the context of this method reduces sulphite to sulphide at 44 °C within 24 hours. *Clostridium perfringens* is non-motile, reduces nitrate, ferments lactose and liquefies gelatin.

4. Principle

A volume of sample is filtered and the membrane filter placed on the surface of an agar medium containing sulphite and iron(III). The agar medium is incubated under anaerobic conditions at 44 °C. *Clostridium perfringens* usually produces black colonies as a result of the reduction of sulphite to sulphide which reacts with the iron(III) salt. If only a spore count is required, then the sample is heat treated at 60 °C prior to filtration in order to kill vegetative bacteria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Limitations

The method is suitable for most types of aqueous samples except those with high turbidities which tend to block the membrane filter. This will limit the volume of sample that can be filtered. Accumulated deposit on the membrane filter may mask or inhibit the growth of indicator organisms. The maximum number of colonies that should be counted from a single membrane is approximately 100.

6. Health and safety

Media, reagents and bacteria used in this method are covered by the Control of Substances Hazardous to Health Regulations(3) and appropriate risk assessments should be made before adopting this method. Standard laboratory microbiology safety procedures should be followed and guidance is given elsewhere(2) in this series.

7. Apparatus

Standard laboratory equipment should be used which conforms to the performance criteria outlined elsewhere(2) in this series. Principally appropriate membrane filtration apparatus and incubators (fan assisted, static temperature) are required. Others items include:

7.1 Sterile sample bottles of appropriate volume, made of suitable material, containing sufficient sodium thiosulphate pentahydrate to give a final concentration in the sample of not less than 18 mg/l (for example, 0.1 ml of a 1.8 % m/v solution of Na2S2O3.5H2O per 100 ml of sample, or equivalent).

7.2 Incubators capable of maintaining temperatures of 37 ± 1.0 °C and 44 ± 0.5 °C.

7.3 Anaerobic jars, or similar equipment, and anaerobic gas-generating system (for generating atmospheres of approximately 9 - 13 % carbon dioxide).

7.4 Filtration apparatus, sterile filter funnels, and source of vacuum.

7.5 Sterile membrane filters, for example, white, 47 mm diameter, cellulose-based, 0.45 μm nominal pore size.

7.6 Smooth-tipped forceps.

8. Media and reagents

Commercial formulations of these media and reagents may be available, but may possess minor variations in their formulation. The performance of all media and reagents should be verified prior to use in this method. Variations in preparation and storage of media should also be verified. Unless otherwise stated chemical constituents are added as anhydrous salts.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.1 *Tryptose sulphite cycloserine agar without egg yolk* (4, 5)

Yeast extract	5 g
Tryptose	15 g
Soya peptone	5 g
Sodium metabisulphite	1 g
Iron(III) ammonium citrate	1 g
Agar	14 g

Distilled, deionised or similar grade water 1 litre

Suspend the ingredients in the water and dissolve by heating and stirring. Sterilise the solution by autoclaving at 121 °C for 15 minutes. Allow the medium to cool to 45 - 48 °C. Add 4 ml of a filter-sterilised solution of D-cycloserine in distilled water at a concentration of 100 mg ml-1. Mix thoroughly, and dispense into Petri dishes. The final pH of the medium should be 7.6 ± 0.2.

Performance of the medium deteriorates during storage due to exposure to oxygen. Prepared media may be stored in a refrigerator under anaerobic conditions at a temperature between 2 - 8 °C for up to one week. However, when fresh medium is used, the colony characteristics that are observed tend to be more defined. Medium, once removed from the refrigerator, should be discarded if not used.

8.2 *Buffered nitrate-motility medium*(6)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Potassium nitrate	5 g
D-Galactose	5 g
Glycerol	5 g
Disodium hydrogen phosphate	2.5 g
Agar	3 g

Distilled, deionised or similar grade water 1 litre

Dissolve the solid ingredients in 950 ml of water by heating to boiling point whilst stirring continuously. Dissolve the glycerol in 50 ml of water in a separate container and add this solution to the base medium and mix thoroughly. Dispense the resulting solution in 10 ml aliquots in appropriately sized capped tubes. Sterilise the medium by autoclaving at 121 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

for 15 minutes. The final pH of the medium should be 7.3 ± 0.2. Prepared tubes may be stored at a temperature between 2 - 8 °C for up to one month if protected against dehydration.

Before use, stored media should be heated for 10 - 15 minutes in a boiling water bath, to ensure that the contents have melted and to eliminate any absorbed oxygen. The tubes are then allowed to cool and the media to solidify ready for use.

8.3 *Nitrate reduction test reagents*

Reagent A	
Sulphanilic acid	0.8 g
5N acetic acid	100 ml

Warm gently to aid dissolving.

Reagent B	
N, N-dimethyl 1-naphthylamine	0.6 ml
5N acetic acid	100 ml

Dissolve the amine in the acetic acid solution. Warm gently to aid dissolving.

The reagents are stable for several months when stored at a temperature between 2 - 8 °C. For the combined reagent, mix equal volumes of reagents A and B immediately prior to use. Prepare in small volumes sufficient for the tests to be performed. The combined reagent may be stored at a temperature between 2 - 8 °C, protected from direct light, and used within 24 hours.

8.4 *Lactose-gelatin medium*(4)

Tryptose	15 g
Yeast extract	10 g
Disodium hydrogen phosphate	5 g
Gelatin	120 g
Lactose	10 g
Phenol red (0.4 % m/v solution)	12.5 ml
Distilled, deionised or similar grade water	1 litre

Dissolve the ingredients, except the gelatin, lactose and phenol red, in the water. Add the gelatin gradually whilst stirring continuously and warming gently to aid dissolving. Adjust the pH to 7.5 ± 0.2. Add the lactose and phenol red and mix thoroughly to dissolve.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dispense the resulting solution in 10 ml aliquots in appropriately sized capped tubes and sterilise the medium at 121 °C for 15 minutes. The final pH should be 7.5 ± 0.2. Prepared media may be stored at a temperature between 2 - 8 °C for up to one month if protected against dehydration.

Before use stored media should be heated for 10 - 15 minutes in a boiling water bath, to ensure that the contents have melted and to eliminate any absorbed oxygen. The tubes are then allowed to cool and the media to solidify ready for use.

8.5 *Other media*

Standard and commercial formulations of other media and reagents used in this method include zinc powder, Ringer's solution and maximum recovery diluent.

9. Analytical procedure

9.1 *Sample preparation*

The volumes, and dilutions, of samples should be chosen so that the number of colonies to be counted on the membrane filter lies, if possible, between 20 and 80. With some waters, it may be advantageous to filter a selection of different volumes of sample so that the number of colonies on one of the membrane filters is likely to fall within this range. For treated waters, filter 100 ml of the sample. For polluted waters either filter smaller volumes, or dilute the sample with Ringer's solution or maximum recovery diluent before filtration.

If it is the intention to count only the spores of *Clostridium perfringens* then the volume of sample should be heated to 60 ± 2 °C (for example in a water bath) and maintained at this temperature for 15 ± 1 minutes. The temperature may be monitored by placing an appropriate thermometer in a reference bottle containing the same volume of water as the sample being treated.

9.2 *Sample processing*

Place the sterile filtration apparatus in position and connect to a source of vacuum, with the stopcock turned off. Remove the funnel and, holding the edge of the membrane filter with sterile smooth-tipped forceps, place a sterile membrane filter, grid-side upwards, on the porous disc of the filter base. Replace the sterile funnel securely on the filter base. Pour or pipette the required volume of sample into the funnel. When the volume of sample to be filtered is less than 10 ml, add 10 - 20 ml of sterile diluent (for example, quarter-strength 15 Ringer's solution or maximum recovery diluent) to the funnel before addition of the sample.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This aids dispersion of the bacteria over the entire surface of the membrane filter during filtration. Open the stopcock and apply a vacuum not exceeding 65 kPa (500 mm of mercury) and filter the sample slowly through the membrane filter. Close the stopcock as soon as the sample has been filtered.

Remove the funnel and transfer the membrane filter carefully to a well-dried tryptose sulphite cycloserine agar Petri dish. Ensure that no air bubbles are trapped between the membrane filter and the medium. 'Rolling' the membrane filter onto the medium minimises the likelihood of air bubbles becoming trapped.

As the spores of *Clostridium perfringens* are very resilient, funnels that have been used once should be sterilised by autoclaving before being used again. Placing funnels in a water bath at this stage may not be sufficient to kill spores. If different volumes of the same sample are to be examined, the funnel may be re-used without sterilising the funnel provided that the smallest volume, or highest dilution of sample, is filtered first. For different samples, take a fresh pre-sterilised funnel and repeat the filtration process. During the filtration of a series of samples, the filter base need not be sterilised unless it becomes contaminated or a membrane filter becomes damaged. When funnels are not in use they should be covered with a sterile lid or a sterile Petri dish lid.

The time between the end of the filtration step and the beginning of the incubation stage should be as short as possible and no longer than 2 hours. Incubate the Petri dishes at 44 °C in an anaerobic jar or similar system containing an indicator of anaerobiosis and an atmosphere containing 9 - 13 % carbon dioxide. Examine the dishes after 21 ± 3 hours incubation.

9.3 *Reading of results*

Under good anaerobic conditions at 44 °C colonies of clostridia are typically black or grey in colour. However, on occasion colourless colonies may be encountered. All colonies growing on tryptose sulphite cycloserine agar at 44 °C should, therefore, be counted as presumptive *Clostridium perfringens*.

9.4 *Confirmation tests*

Depending on the intended purpose of the analysis and the required accuracy, sub-culture a suitable number of colonies. If the aim is to estimate the number of organisms present, then for the greatest accuracy, all colonies should be sub-cultured if fewer than ten are present or, at least ten colonies should be sub-cultured if more than ten are present.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

For each isolate, inoculate a tube of buffered nitrate-motility medium by stabbing the medium with a straight wire to just above the bottom of the tube and incubate anaerobically at 37 °C for 21 ± 3 hours. To test for nitrate reduction, add a few drops, approximately 0.2 - 0.5 ml, of the combined nitrate reduction test reagent to each tube. A red colour forming within 15 minutes indicates nitrate reduction to nitrite and the test is regarded as being positive. If a red colour does not develop within this time, add a small amount of zinc powder and leave to stand for 10 minutes. If after this time there is still no red colour this indicates that nitrate has been reduced to nitrite, which has been further reduced. The test is regarded as being positive. However, if a red colour subsequently develops after the addition being negative.

In addition, inoculate a tube of lactose-gelatin medium by stabbing the medium with a straight wire and incubate anaerobically at 37 °C for 44 ± 4 hours. After incubation the medium will be liquid, irrespective of whether gelatin liquefaction has occurred or not. In order to establish whether gelatin liquefaction has occurred the tubes should be placed in a refrigerator for at least one hour. Gelatin liquefaction will have occurred in tubes where the medium remains liquid after refrigeration.

If necessary, the tubes may be examined after incubating at 37 °C for 21 ± 3 hours and refrigerated (for example, for about one hour) and if gelatin liquefaction occurs, i.e. the test is regarded as positive, the result is recorded. If negative, i.e. the medium remains solid after refrigeration, the tubes should be returned to the incubator. Incubation should be continued until the total incubation period of 44 ± 4 hours has been achieved. The tubes are then reexamined. A set of control tubes inoculated with appropriate positive and negative strains should be incubated and tested in parallel.

Clostridium perfringens is confirmed by the following reactions:

(i) Non-motile - growth along the line of the stab and not spread through buffered nitratemotility medium.

(ii) Nitrate reduction - red colour after addition of combined nitrate reduction test reagent to buffered nitrate-motility medium, or remaining colourless after addition of zinc powder.

(iii) Lactose fermentation - orange/yellow colouration of lactose-gelatin medium.

(iv) Gelatin liquefaction - contents of the lactose-gelatin medium tube become liquefied. Further identification may be carried out by means of appropriate biochemical and other tests. Suitable commercial identification kits may be used following appropriate performance verification at the laboratory.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Calculations

10.1 Presumptive *Clostridium perfringens*

The number of presumptive *Clostridium perfringens* colonies is generally quoted as the number of colonies per 100 ml. Calculate the presumptive count as follows:

Presumptive count/100 ml = Number of colonies x 100 Volume of sample filtered (ml)

10.2 Confirmed *Clostridium perfringens*

The number of confirmed *Clostridium perfringens* colonies is calculated by multiplying the number of presumptive *Clostridium perfringens* by the proportion of the isolates that are non-motile, reduce nitrate, ferment lactose and liquefy gelatin.

11. Expression of results

The number of presumptive and confirmed *Clostridium perfringens* is expressed in colony forming units per volume of sample. For drinking waters, the volume is typically 100 ml.

12 . Quality assurance

New batches of isolation medium should be tested with appropriate reference strains of target bacteria (for example *Clostridium perfringens*) and non-target bacteria (for example *Bacillus* species). New batches of confirmatory media and reagents should be tested with appropriate reference strains of bacteria chosen to verify a positive and a negative reaction in each case. Petri dishes should be incubated for 21 ± 3 hours at 37 °C or 44 °C as appropriate. Further details are given elsewhere(2) in this series.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็ง วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique

ตารางที่ ค.1 อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique (ความเข้มข้นสปอร์ *C. perfringens* น้ำดื่ม 1 – 9 cfu/ml)

จำนวน *C. perfringens* ในตัวอย่าง (cfu/ml)				อัตราการลดลงของ *C. perfringens* (%)		
น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
3	1	0	0	66.67	100.00	100.00
2	0	2	0	100.00	0.00	100.00
2	0	2	0	100.00	0.00	100.00
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
3	0	0	0	100.00	100.00	100.00
0	0	0	0	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
0	0	0	0	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น
10	1	0	0	90.00	100.00	100.00
6	1	0	0	83.33	100.00	100.00
4	1	0	0	75.00	100.00	100.00
8	1	0	0	87.50	100.00	100.00
3	1	0	0	66.67	100.00	100.00
4	1	0	0	75.00	100.00	100.00
0	0	0	0	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
1	0	0	0	100.00	100.00	100.00
0	0	0	0	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น	ไม่มีเชื้อเริ่มต้น
2.55	0.35	0.2	0	90.26	87.50	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique (ความเข้มข้นสปอร์ *C. perfringens* น้ำดื่ม 10 – 99 cfu/ml)

จำนวน *C. perfringens* ในตัวอย่าง (cfu/ml)				อัตราลดลงของC. perfringens ในตัวอย่าง (%)		
น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	วันแข็ง 7 วัน	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	วันแข็ง 7 วัน
10	3	1	0	70.00	90.00	100.00
12	1	2	0	91.67	86.11	100.00
16	2	2	0	89.58	85.42	100.00
34	0	0	0	100.00	100.00	100.00
17	0	0	0	100.00	100.00	100.00
15	1	0	0	95.56	100.00	100.00
73	8	0	0	88.58	100.00	100.00
16	0	0	0	100.00	100.00	100.00
18	1	0	0	96.30	100.00	100.00
22	0	0	0	100.00	100.00	100.00
43	0	0	0	100.00	100.00	100.00
17	0	0	0	98.04	100.00	100.00
57	3	0	0	94.15	100.00	100.00
34	1	0	0	98.04	100.00	100.00
16	0	0	0	100.00	100.00	100.00
13	1	0	0	94.87	100.00	100.00
52	2	0	0	95.51	99.36	100.00
18	0	2	0	100.00	90.74	100.00
16	0	3	0	100.00	83.33	100.00
50	3	2	0	94.67	95.33	100.00
อัตราการลดลงเฉลี่ย				94.76	96.42	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

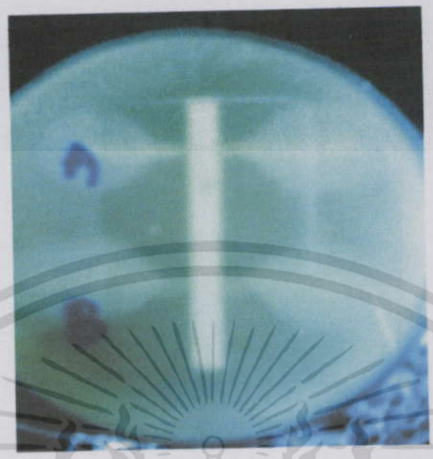
ตารางที่ ค.1 อัตราการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* ในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน วิเคราะห์โดย Pour Plate Technique (ความเข้มข้นสปอร์ *C. perfringens* น้ำดื่ม 100 – 999 cfu/ml)

จำนวน *C. perfringens* ในตัวอย่าง (cfu/ml)				อัตราลดลงของ*C. perfringens* ในตัวอย่าง (%)		
น้ำดื่ม	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน	น้ำแข็ง 1 วัน	น้ำแข็ง 4 วัน	น้ำแข็ง 7 วัน
137	sp*	117	45	-*	14.60	67.15
570	160	22	11	71.93	96.14	98.07
291	86	142	44	70.45	51.20	84.88
720	160	22	7	77.78	96.94	99.03
740	160	22	11	78.38	97.03	98.51
264	sp*	34	50	-*	87.12	81.06
510	200	29	10	60.78	94.31	98.04
810	190	25	7	76.54	96.91	99.14
480	180	23	2	62.50	95.21	99.58
500	220	29	63	56.00	94.20	87.40
590	230	102	3	61.02	82.71	99.49
630	170	104	3	73.02	83.49	99.52
500	sp*	81	7	-*	83.80	98.60
480	180	23	2	62.50	95.21	99.58
510	140	29	8	72.55	94.31	98.43
211	67	132	8	68.25	37.44	96.21
198	54	139	49	72.73	29.80	75.25
119	29	126	12	75.63	-*	89.92
132	45	122	16	65.91	7.58	87.88
144	sp*	117	45	-*	18.75	68.75
อัตราการลดลงเฉลี่ย				69.12	71.41	91.32

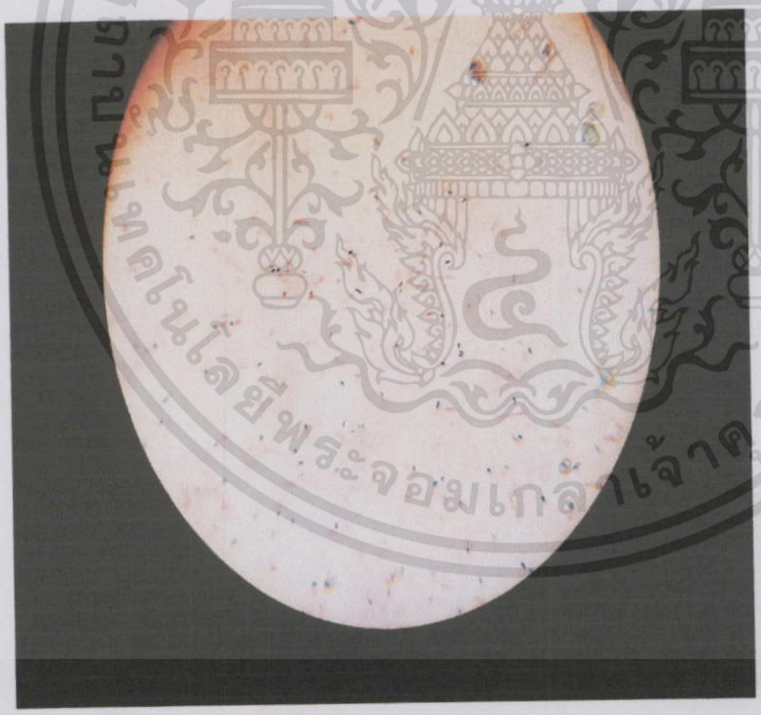
*เกิดการแผ่ลามของโคโลนีทำให้ไม่สามารถนับจำนวนและใช้ในการคำนวณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
รูปจากการทดลอง

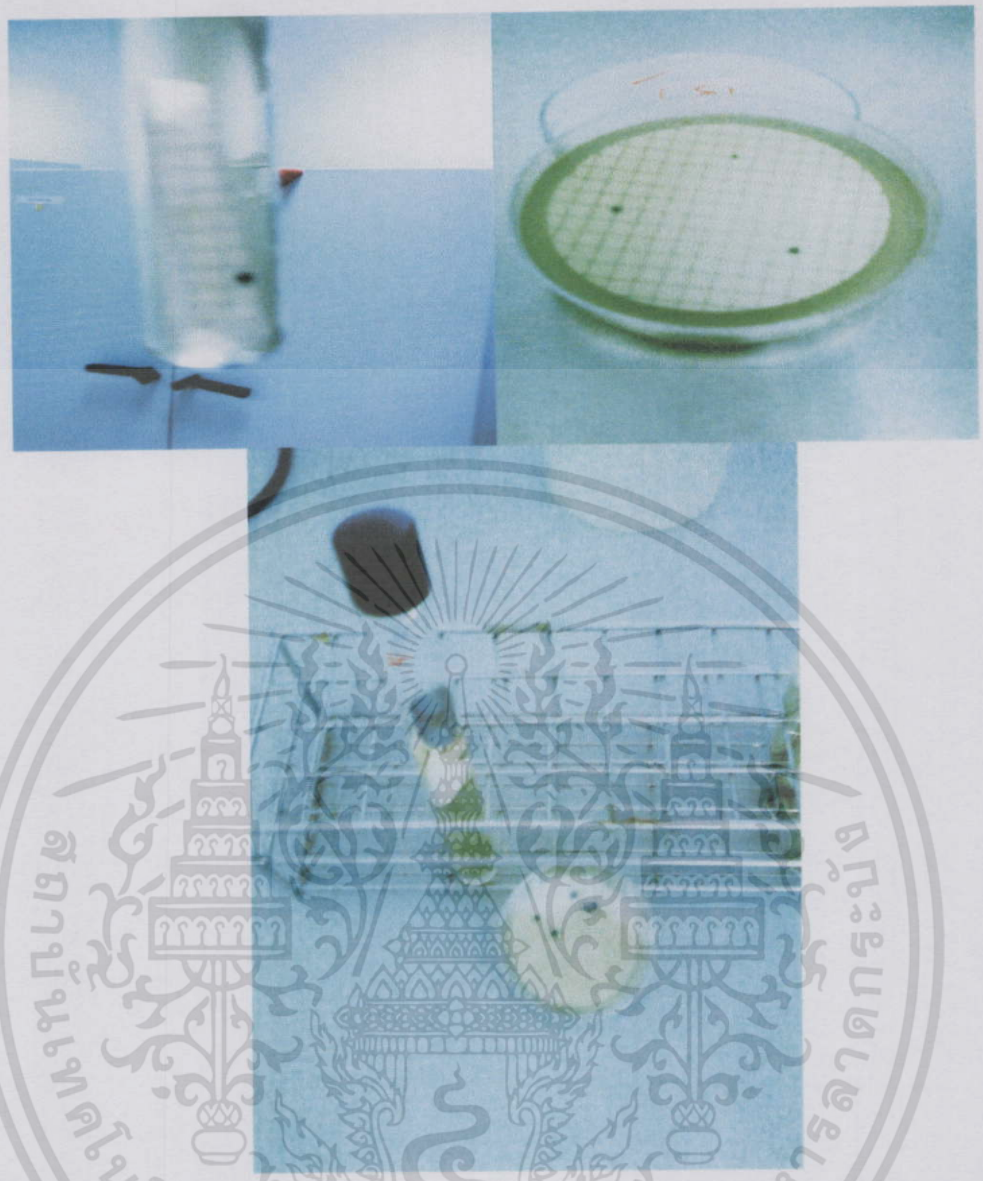


รูปที่ ง.1 ผลการทดสอบ Negler's test ของ *C. perfringens* ที่นำมาใช้ในการทดลอง



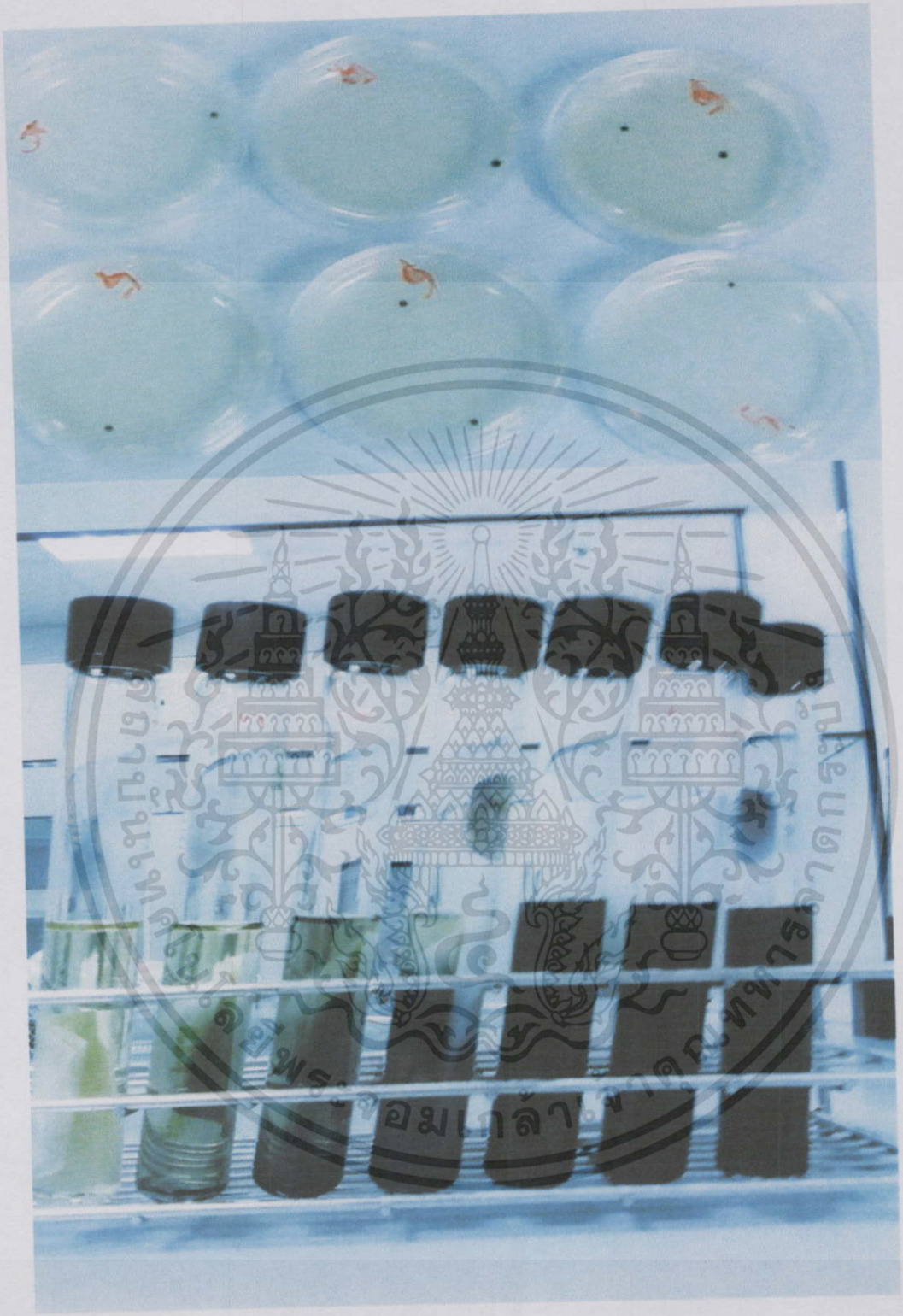
รูปที่ ง.2 การตรวจสอบการเกิดสปอร์ก่อนนำไปให้ความร้อน โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



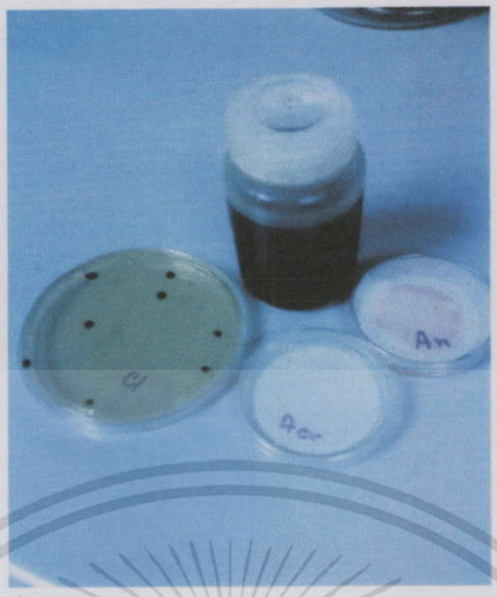
รูปที่ ง.3 ผลทดสอบวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำและน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.4 การหาค่า Relative detection level

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.5 การควบคุมคุณภาพ (CI : การนับจำนวน *C. perfringens* ที่เพาะลงในตัวอย่างโดยการ pour plate ด้วย TSC agar, Aer : การทดสอบอยู่รอดของ *C. perfringens* และ *E.coli* ที่เพาะลงในตัวอย่างโดยการ pour plate ด้วย PCA agar และบ่มเพาะเชื้อในสภาวะมีออกซิเจน, An:การทดสอบอยู่รอดของ *C. perfringens* และ *E.coli* ที่เพาะลงในตัวอย่างโดยการ pour plate ด้วย PCA agar และบ่มเพาะเชื้อในสภาวะไม่มีออกซิเจน

รูปที่ ง.6 Modified TSC broth เข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type Aเบื้องต้นในน้ำดื่ม

1. ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ Modified TSC medium

ตารางที่ จ.1 ผลการเปรียบเทียบ TSC broth ที่ทำการบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนกับ Modified TSC medium

ความเข้มข้นของ *C. perfringens* (cfu/1 mL)	จำนวนหลอด TSC broth ที่ให้ผลบวก (หลอด)	จำนวนหลอด Modified TSC medium ที่ให้ผลบวก (หลอด)
1-3	8	9
10-30	30	25
100-300	30	30
ร้อยละของจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	75.56	71.11

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type Aเบื้องต้นในน้ำดื่ม

ตารางที่ จ.2 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

C. perfringens (cfu/1 mL)	TSC agar	Modified TSC medium
	จานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
0	0/6	0/6
1- 5	5/6	1/6
6- 10	6/6	6/6
11 – 100	6/6	6/6
>150	6/6	6/6

ดังนั้น Relative detection level คือ >1 cfu/ml ถึง < 10 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ				ลำดับที่	ช่วง 1- 9 cfu/ml			
	TSC agar (ค่าเฉลี่ย)		M-TSC			TSC agar (ค่าเฉลี่ย)		M-TSC	
1	0	-	-,-,-	-	1	3	+	+,+,-	+
2	0	-	-,-,-	-	2	2	+	+,+,+	+
3	0	-	-,-,-	-	3	2	+	+,-,+	+
4	0	-	-,-,-	-	4	1	+	+,+,-	+
5	0	-	-,-,-	-	5	3	+	+,+,-	+
6	0	-	-,-,-	-	6	0	-	-,-,-	-
7	0	-	-,-,-	-	7	1	+	-,+,-	+
8	0	-	-,-,-	-	8	1	+	-,-,-	-
9	0	-	-,-,-	-	9	1	+	-,-,-	-
10	0	-	-,-,-	-	10	0	-	-,-,-	-
11	0	-	-,-,-	-	11	10	+	+,+,+	+
12	0	-	-,-,-	-	12	6	+	+,+,+	+
13	0	-	-,-,-	-	13	4	+	+,+,+	+
14	0	-	-,-,-	-	14	8	+	+,+,+	+
15	0	-	-,-,-	-	15	3	+	+,+,+	+
16	0	-	-,-,-	-	16	4	+	+,+,+	+
17	0	-	-,-,-	-	17	0	-	-,-,-	-
18	0	-	-,-,-	-	18	1	+	+,+,-	+
19	0	-	-,-,-	-	19	1	+	+,+,+	+
20	0	-	-,-,-	-	20	0	-	-,-,-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ช่วง 10 – 99 cfu/ml				ลำดับที่	ช่วง 100 – 999 cfu/ml			
	TSC agar		M-TSC			TSC agar		M-TSC	
1	10	+	-,+,+	+	1	137	+	+,+,+	+
2	12	+	+,+,+	+	2	570	+	+,+,+	+
3	16	+	+,+,+	+	3	291	+	+,+,+	+
4	34	+	+,+,+	+	4	720	+	+,+,+	+
5	17	+	+,+,+	+	5	740	+	+,+,+	+
6	15	+	+,+,+	+	6	264	+	+,+,+	+
7	73	+	+,+,+	+	7	510	+	+,+,+	+
8	16	+	+,+,+	+	8	810	+	+,+,+	+
9	18	+	+,+,+	+	9	480	+	+,+,+	+
10	22	+	+,+,+	+	10	500	+	+,+,+	+
11	43	+	+,+,+	+	11	590	+	+,+,+	+
12	17	+	+,+,+	+	12	630	+	+,+,+	+
13	57	+	+,+,+	+	13	500	+	+,+,+	+
14	34	+	+,+,+	+	14	480	+	+,+,+	+
15	16	+	+,+,+	+	15	510	+	+,+,+	+
16	13	+	+,+,+	+	16	211	+	+,+,+	+
17	52	+	+,+,+	+	17	198	+	+,+,+	+
18	18	+	+,+,+	+	18	119	+	+,+,+	+
19	16	+	+,+,+	+	19	132	+	+,+,+	+
20	50	+	+,+,+	+	20	144	+	+,+,+	+

ดังนั้น PA เท่ากับ 54

PD เท่ากับ 0

NA เท่ากับ 24

ND เท่ากับ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) จากสูตร

$$\text{Relative sensivity} = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (54/(54+2)) \times 100$$

$$= 96\%$$

2.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative specificity} = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$$

$$= (24/(24+0) \times 100$$

$$= 100\%$$

2.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative accuracy} = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\%$$

$$= ((54+24)/80) \times 100$$

$$= 97.5\%$$

2.4 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (| 0-2 | - 1)^2 / (0+2)$$

$$= 0.5$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type Aเบื้องต้นในน้ำแข็ง

3.1 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบ

กับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน

ตารางที่ จ.5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ไม่มีการเพาะเชื้อ					ช่วง 1- 9 cfu/ml				
ลำดับที่	TSC agar		M-TSC		ลำดับที่	TSC agar		M-TSC	
1	0	-	-,-,-	-	1	1	+	-,-,+	+
2	0	-	-,-,-	-	2	0	-	+,-,-	+
3	0	-	-,-,-	-	3	0	-	-,-,-	-
4	0	-	-,-,-	-	4	0	-	+,-,-	+
5	0	-	-,-,-	-	5	0	-	-,-,-	-
6	0	-	-,-,-	-	6	0	-	-,-,-	-
7	0	-	-,-,-	-	7	0	-	-,-,-	-
8	0	-	-,-,-	-	8	0	-	-,-,-	-
9	0	-	-,-,-	-	9	0	-	-,-,-	-
10	0	-	-,-,-	-	10	0	-	-,-,-	-
11	0	-	-,-,-	-	11	1	+	+,+,+	+
12	0	-	-,-,-	-	12	1	+	-,+,+	+
13	0	-	-,-,-	-	13	1	+	+,-,-	+
14	0	-	-,-,-	-	14	1	+	+,+,+	+
15	0	-	-,-,-	-	15	1	+	-,-,-	-
16	0	-	-,-,-	-	16	1	+	+,-,+	+
17	0	-	-,-,-	-	17	0	-	-,-,-	-
18	0	-	-,-,-	-	18	0	-	-,-,-	-
19	0	-	-,-,-	-	19	0	-	-,-,-	-
20	0	-	-,-,-	-	20	0	-	-,-,-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ช่วง 10 – 99 cfu/ml					ช่วง 100 – 999 cfu/ml				
ลำดับที่	TSC agar		M-TSC		ลำดับที่	TSC agar		M-TSC	
1	3	+	+,-,+	+	1	sp	+	+,+,+	+
2	1	+	+,+,-	+	2	160	+	+,+,+	+
3	2	+	+,-,-	+	3	86	+	+,+,+	+
4	1	+	+,-,-	+	4	160	+	+,+,+	+
5	1	+	+,-,-	+	5	160	+	+,+,+	+
6	1	+	+,+,-	+	6	Sp	+	+,+,+	+
7	8	+	+,-,-	+	7	200	+	+,+,+	+
8	1	+	+,+,-	+	8	190	+	+,+,+	+
9	1	+	-,-,-	-	9	180	+	+,+,+	+
10	0	-	-,-,+	+	10	220	+	+,+,+	+
11	1	+	+,-,-	+	11	230	+	+,+,+	+
12	1	+	+,+,-	+	12	170	+	+,+,+	+
13	3	+	+,-,-	+	13	Sp	+	+,+,+	+
14	1	+	-,-,-	-	14	180	+	+,+,+	+
15	1	+	+,-,-	+	15	140	+	+,+,+	+
16	1	+	+,-,-	+	16	67	+	+,+,+	+
17	2	+	+,+,+	+	17	54	+	+,+,+	+
18	1	+	+,+,+	+	18	29	+	+,+,+	+
19	1	+	+,+,+	+	19	45	+	+,+,+	+
20	3	+	+,+,+	+	20	Sp	+	+,+,+	+

ดังนั้น PA เท่ากับ 43

PD เท่ากับ 3

NA เท่ากับ 31

ND เท่ากับ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity) จากสูตร

$$\text{Relative sensivity} = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (43/(43+3)) \times 100$$

$$= 93\%$$

3.2.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative specificity} = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$$

$$= (31/(31+3) \times 100$$

$$= 91\%$$

3.2.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative accuracy} = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\%$$

$$= ((43+31)/80) \times 100$$

$$= 92.5\%$$

3.2.4 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|3-3| - 1)^2/(3+3)$$

$$= 0.17$$

A Chi-square value น้อยกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน

ตารางที่ จ.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	จากน้ำดื่มไม่มีการเพาะเชื้อ				ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 1- 9 cfu/ml			
	TSC agar		M-TSC			TSC agar		M-TSC	
1	0	-	-,-,-	-	1	0	-	-,-,-	-
2	0	-	-,-,-	-	2	2	+	-,+,-	+
3	0	-	-,-,-	-	3	2	+	+,+,-	+
4	0	-	-,-,-	-	4	0	-	-,-,-	-
5	0	-	-,-,-	-	5	0	-	-,-,-	-
6	0	-	-,-,-	-	6	0	-	-,-,-	-
7	0	-	-,-,-	-	7	0	-	-,-,-	-
8	0	-	-,-,-	-	8	0	-	-,-,-	-
9	0	-	-,-,-	-	9	0	-	-,-,-	-
10	0	-	-,-,-	-	10	0	-	-,-,-	-
11	0	-	-,-,-	-	11	0	-	-,-,-	-
12	0	-	-,-,-	-	12	0	-	-,-,-	-
13	0	-	-,-,-	-	13	0	-	-,-,-	-
14	0	-	-,-,-	-	14	0	-	-,-,-	-
15	0	-	-,-,-	-	15	0	-	-,-,-	-
16	0	-	-,-,-	-	16	0	-	-,-,-	-
17	0	-	-,-,-	-	17	0	-	-,-,-	-
18	0	-	-,-,-	-	18	0	-	-,-,-	-
19	0	-	-,-,-	-	19	0	-	-,-,-	-
20	0	-	-,-,-	-	20	0	-	-,-,-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.6 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 10 – 99 cfu/ml				ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 100 – 999 cfu/ml			
	TSC agar		M-TSC			TSC agar		M-TSC	
1	1	+	-,+,-	+	1	117	+	+,+,+	+
2	2	+	+,+,-	+	2	22	+	+,+,+	+
3	2	+	-,+,-	+	3	142	+	+,+,+	+
4	0	-	-,-,-	-	4	22	+	+,+,+	+
5	0	-	-,-,-	-	5	22	+	+,+,+	+
6	0	-	-,-,-	-	6	34	+	+,+,+	+
7	0	-	-,-,-	-	7	29	+	+,+,+	+
8	0	-	-,-,-	-	8	25	+	+,+,+	+
9	1	+	-,-,-	-	9	23	+	+,+,+	+
10	0	-	-,-,-	-	10	29	+	+,+,+	+
11	0	-	-,-,-	-	11	102	+	+,+,+	+
12	0	-	-,-,-	-	12	104	+	+,+,+	+
13	0	-	-,-,-	-	13	81	+	+,+,+	+
14	0	-	-,-,-	-	14	23	+	+,+,+	+
15	0	-	-,-,-	-	15	29	+	+,+,+	+
16	0	-	-,-,-	-	16	132	+	+,+,+	+
17	1	+	-,-,-	-	17	139	+	+,+,+	+
18	2	+	+,-,-	+	18	126	+	+,+,+	+
19	3	+	+,+,+	+	19	122	+	+,+,+	+
20	2	+	+,+,+	+	20	117	+	+,+,+	+

ดังนั้น PA เท่ากับ 28

PD เท่ากับ 0

NA เท่ากับ 50

ND เท่ากับ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative} \quad sensivity = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (28/(28+2)) \times 100$$

$$= 93\%$$

3.3.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative} \quad specificity = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$$

$$= (50/(50+0) \times 100$$

$$= 100\%$$

3.3.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative } accuracy = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\%$$

$$= ((54+24)/80) \times 100$$

$$= 97.5\%$$

3.3.4 หานัยสำคัญของความแตกต่าง โดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|0-2| - 1)^2 / (0+2)$$

$$= 0.5$$

A Chi-square value น้อยกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของอาหารคัดแยกเชื้อที่ดัดแปลงขึ้นเทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ ISO หมายเลข ISO7937:2004 ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน

ตารางที่ จ.7 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	จากน้ำดื่มไม่มีการเพาะเชื้อ				ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 1- 9 cfu/ml			
	TSC agar		M-TSC			TSC agar		M-TSC	
1	0	-	-,-,-	-	1	0	-	-,-,-	-
2	0	-	-,-,-	-	2	0	-	-,-,-	-
3	0	-	-,-,-	-	3	0	-	-,-,-	-
4	0	-	-,-,-	-	4	0	-	-,-,-	-
5	0	-	-,-,-	-	5	0	-	-,-,-	-
6	0	-	-,-,-	-	6	0	-	-,-,-	-
7	0	-	-,-,-	-	7	0	-	-,-,-	-
8	0	-	-,-,-	-	8	0	-	-,-,-	-
9	0	-	-,-,-	-	9	0	-	-,-,-	-
10	0	-	-,-,-	-	10	0	-	-,-,-	-
11	0	-	-,-,-	-	11	0	-	-,-,-	-
12	0	-	-,-,-	-	12	0	-	-,-,-	-
13	0	-	-,-,-	-	13	0	-	-,-,-	-
14	0	-	-,-,-	-	14	0	-	-,-,-	-
15	0	-	-,-,-	-	15	0	-	-,-,-	-
16	0	-	-,-,-	-	16	0	-	-,-,-	-
17	0	-	-,-,-	-	17	0	-	-,-,-	-
18	0	-	-,-,-	-	18	0	-	-,-,-	-
19	0	-	-,-,-	-	19	0	-	-,-,-	-
20	0	-	-,-,-	-	20	0	-	-,-,-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.7 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม ISO 7937:2004 ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 10 – 99 cfu/ml				ลำดับที่	จากน้ำดื่มช่วง 100 – 999 cfu/ml			
	TSC agar		M-TSC			TSC agar		M-TSC	
1	0	-	-,-,-	-	1	45	+	+,+,+	+
2	0	-	-,-,-	-	2	11	+	+,+,+	+
3	0	-	-,-,-	-	3	44	+	+,+,+	+
4	0	-	-,-,-	-	4	7	+	+,+,+	+
5	0	-	-,-,-	-	5	11	+	+,+,+	+
6	0	-	-,-,-	-	6	50	+	+,+,+	+
7	0	-	-,-,-	-	7	10	+	+,+,+	+
8	0	-	-,-,-	-	8	7	+	+,+,+	+
9	0	-	-,-,-	-	9	2	+	+,+,+	+
10	0	-	-,-,-	-	10	63	+	+,+,+	+
11	0	-	-,-,-	-	11	3	+	+,+,+	+
12	0	-	-,-,-	-	12	3	+	+,+,+	+
13	0	-	-,-,-	-	13	7	+	+,+,+	+
14	0	-	-,-,-	-	14	2	+	+,+,+	+
15	0	-	-,-,-	-	15	8	+	+,+,+	+
16	0	-	-,-,-	-	16	8	+	+,+,+	+
17	0	-	-,-,-	-	17	49	+	+,+,+	+
18	0	-	-,-,-	-	18	12	+	+,+,+	+
19	0	-	-,-,-	-	19	16	+	+,+,+	+
20	0	-	-,-,-	-	20	45	+	+,+,+	+

ดังนั้น PA เท่ากับ 20

PD เท่ากับ 0

NA เท่ากับ 60

ND เท่ากับ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative}\quad sensivity = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (20/(20+0)) \times 100$$

$$= 100\%$$

3.4.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative}\quad specificity = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$$

$$= (60/(60+0) \times 100$$

$$= 100\%$$

3.4.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative}\ accuracy = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\%$$

$$= ((80)/80) \times 100$$

$$= 100\%$$

3.4.4 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|0-0| - 1)^2 / (0+0)$$

= ไม่สามารถหาค่าได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่มและน้ำแข็ง

1. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่ม

1.1 การหาค่า Relative detection level

ตารางที่ ฉ.1 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

C. perfringens (cfu/1 mL)	TSC agar	Modified TSC medium
	จานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
1- 10	4/6	0/6
11 – 20	6/6	2/6
21 – 30	6/6	5/6
31 – 40	6/6	6/6

ดังนั้น Relative detection level คือ >20 cfu/ml ถึง <30 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำดื่ม

ตารางที่ ฉ.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่ม โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ			ลำดับที่	ช่วง 1-9 cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	0	-	-
2	0	-	-	2	1	+	-
3	0	-	-	3	5	+	-
4	0	-	-	4	1	+	-
5	0	-	-	5	1	+	-
6	0	-	-	6	4	+	-
7	0	-	-	7	1	+	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	2	+	-
10	0	-	-	10	1	+	-
11	0	-	-	11	4	+	-
12	0	-	-	12	9	+	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	1	+	-
15	0	-	-	15	7	+	-
16	0	-	-	16	6	+	-
17	0	-	-	17	0	-	-
18	0	-	-	18	3	+	-
19	0	-	-	19	7	+	-
20	0	-	-	20	0	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.2 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำดื่มโดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ช่วง 10 – 99 cfu/100 ml			ลำดับที่	ช่วง 100-999cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	20	+	+	1	481	+	+
2	23	+	+	2	648	+	+
3	19	+	+	3	187	+	+
4	19	+	+	4	109	+	+
5	16	+	+	5	139	+	+
6	17	+	+	6	164	+	+
7	16	+	+	7	199	+	+
8	16	+	+	8	110	+	+
9	17	+	+	9	232	+	-
10	16	+	+	10	201	+	+
11	12	+	+	11	205	+	+
12	11	+	-	12	212	+	+
13	15	+	+	13	107	+	+
14	36	+	+	14	110	+	+
15	33	+	+	15	102	+	+
16	87	+	+	16	114	+	+
17	42	+	+	17	145	+	+
18	38	+	+	18	122	+	+
19	11	+	-	19	132	+	+
20	71	+	+	20	120	+	+

PA = 38

PD = 0

NA = 25

ND = 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative} \quad sensivity = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (38/(38+17)) \times 100$$

$$= 69.09\ \%$$

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative} \quad specificity = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\%$$

$$= (25/(25+0) \times 100$$

$$= 100\ \%$$

การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative}\ accuracy = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\%$$

$$= ((38+25)/80) \times 100$$

$$= 78.75\ \%$$

หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (\ |\ 0\text{-}17\ |\ - 1)^2 / (0+17)$$

$$= 15.05$$

A Chi-square value มากกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็ง

2.1 การหาค่า Relative detection level

ตารางที่ ฉ.3 จำนวนผลบวกจากการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

C. perfringens (cfu/1 mL)	TSC agar	Modified TSC medium
	จานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก
1- 100	6/6	0/0
100 – 200	6/6	3/6
201 – 300	6/6	4/6
301 – 400	6/6	6/6
401 – 500	6/6	6/6

ดังนั้น Relative detection level ได้เท่ากับ >100 cfu/ml ถึง <200 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน

ตารางที่ ฉ.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ			ลำดับที่	ช่วง 1-9 cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	0	-	-
2	0	-	-	2	0	-	-
3	0	-	-	3	0	-	-
4	0	-	-	4	0	-	-
5	0	-	-	5	0	-	-
6	0	-	-	6	0	-	-
7	0	-	-	7	0	-	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	0	-	-
10	0	-	-	10	0	-	-
11	0	-	-	11	0	-	-
12	0	-	-	12	2	+	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	0	-	-
15	0	-	-	15	1	+	-
16	0	-	-	16	1	+	-
17	0	-	-	17	0	-	-
18	0	-	-	18	0	-	-
19	0	-	-	19	4	+	-
20	0	-	-	20	0	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.4 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 1 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ช่วง 10 – 99 cfu/100 ml			ลำดับที่	ช่วง 100-999cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	Sp	+	+	1	Sp	+	+
2	10	+	+	2	Sp	+	+
3	7	+	-	3	Sp	+	+
4	10	+	+	4	7	+	+
5	4	+	-	5	Sp	+	+
6	6	+	-	6	Sp	+	+
7	7	+	-	7	78	+	+
8	6	+	-	8	56	+	+
9	Sp	+	+	9	77	+	+
10	8	+	-	10	Sp	+	+
11	5	+	-	11	62	+	+
12	6	+	-	12	42	+	+
13	7	+	-	13	Sp	+	+
14	11	+	+	14	79	+	+
15	13	+	+	15	Sp	+	+
16	Sp	+	+	16	Sp	+	+
17	25	+	+	17	91	+	+
18	12	+	+	18	88	+	+
19	8	+	-	19	Sp	+	+
20	26	+	+	20	Sp	+	+

PA = 30

PD = 0

NA = 36

ND = 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative} \quad sensivity = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\ \%$$

$$= (9/(9+34)) \times 100$$

$$= 21.9\ \%$$

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative} \quad specificity = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\ \%$$

$$= (37/(37+0) \times 100$$

$$= 100\ \%$$

การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative}\ accuracy = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\ \%$$

$$= ((9+37)/80) \times 100$$

$$= 57.5\ \%$$

หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|0-34| - 1)^2/(0+34)$$

$$= 32.0$$

A Chi-square value มากกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน

ตารางที่ ฉ.5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ			ลำดับที่	ช่วง 1- 9cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	0	-	-
2	0	-	-	2	0	-	-
3	0	-	-	3	0	-	-
4	0	-	-	4	0	-	-
5	0	-	-	5	0	-	-
6	0	-	-	6	0	-	-
7	0	-	-	7	0	-	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	0	-	-
10	0	-	-	10	0	-	-
11	0	-	-	11	0	-	-
12	0	-	-	12	0	-	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	0	-	-
15	0	-	-	15	1	+	-
16	0	-	-	16	0	-	-
17	0	-	-	17	0	-	-
18	0	-	-	18	0	-	-
19	0	-	-	19	1	+	-
20	0	-	-	20	0	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.5 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 4 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ช่วง 10 – 99 cfu/100 ml			ลำดับที่	ช่วง 100-999cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	5	+	-
2	0	-	-	2	0	-	-
3	0	-	-	3	3	+	-
4	0	-	-	4	1	+	+
5	0	-	-	5	0	-	+
6	0	-	-	6	0	-	-
7	0	-	-	7	0	-	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	2	+	-
10	0	-	-	10	0	-	-
11	0	-	-	11	0	-	-
12	0	-	-	12	0	-	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	0	-	-
15	0	-	-	15	0	-	-
16	0	-	-	16	0	-	-
17	0	-	-	17	3	+	-
18	0	-	-	18	0	-	-
19	0	-	-	19	1	+	-
20	22	-	-	20	1	+	+

PA = 2

PD = 1

NA = 70

ND = 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative sensivity} = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\ \%$$

$$= (2/(2+7)) \times 100$$

$$= 22.2\ \%$$

2.3.1.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative specificity} = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\ \%$$

$$= (70/(70+1) \times 100$$

$$= 98.6\ \%$$

2.3.1.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative accuracy} = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\ \%$$

$$= ((2+70)/80) \times 100$$

$$= 90\ \%$$

2.3.1.4 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|1-7| - 1)^2/(1+7)$$

$$= 3.12$$

A Chi-square value น้อยกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของวิธีที่ดัดแปลงขึ้น เทียบกับวิธีวิเคราะห์ของ Environment agency ในการวิเคราะห์หา *C. perfringens* type A เบื้องต้นในน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน

ตารางที่ ฉ.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ไม่มีการเพาะเชื้อ			ลำดับที่	ช่วง 1-9 cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	0	-	-
2	0	-	-	2	0	-	-
3	0	-	-	3	0	-	-
4	0	-	-	4	0	-	-
5	0	-	-	5	0	-	-
6	0	-	-	6	0	-	-
7	0	-	-	7	0	-	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	0	-	-
10	0	-	-	10	0	-	-
11	0	-	-	11	0	-	-
12	0	-	-	12	0	-	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	0	-	-
15	0	-	-	15	0	-	-
16	0	-	-	16	0	-	-
17	0	-	-	17	0	-	-
18	0	-	-	18	0	-	-
19	0	-	-	19	2	+	-
20	0	-	-	20	0	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ฉ.6 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำแข็งที่ผ่านการแช่แข็ง 7 วัน โดยการวิเคราะห์ตาม Environment agency ซึ่งใช้ TSC agar และวิธีที่ดัดแปลงขึ้นซึ่งใช้ Modified TSC medium

ลำดับที่	ช่วง 10 – 99 cfu/100 ml			ลำดับที่	ช่วง 100-999cfu/100 ml		
	TSC agar		M-TSC		TSC agar		M-TSC
1	0	-	-	1	4	+	+
2	0	-	-	2	0	-	-
3	0	-	-	3	0	-	-
4	0	-	-	4	0	-	-
5	0	-	-	5	0	-	-
6	0	-	-	6	0	-	-
7	0	-	-	7	0	-	-
8	0	-	-	8	0	-	-
9	0	-	-	9	2	+	-
10	0	-	-	10	0	-	-
11	0	-	-	11	0	-	-
12	0	-	-	12	0	-	-
13	0	-	-	13	0	-	-
14	0	-	-	14	0	-	-
15	0	-	-	15	0	-	-
16	0	-	-	16	0	-	-
17	0	-	-	17	0	-	-
18	0	-	-	18	0	-	-
19	0	-	-	19	1	+	-
20	8	+	-	20	1	+	+

PA = 2

PD = 0

NA = 74

ND = 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.1 ความไวของวิธีการวิเคราะห์ (Relative sensivity)จากสูตร

$$\text{Relative sensivity} = \frac{PA}{PA + ND} \times 100\%$$

$$= (2/(2+4)) \times 100$$

$$= 33.3\ \%$$

2.4.1.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Relative specificity) จากสูตร

$$\text{Relative specificity} = \frac{NA}{NA + PD} \times 100\ \%$$

$$= (74/(74+0) \times 100$$

$$= 100\ \%$$

2.4.1.3 การหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Relative accuracy) จากสูตร

$$\text{Relative accuracy} = \frac{PA + NA}{PA + PD + NA + ND} \times 100\ \%$$

$$= ((2+74)/80) \times 100$$

$$= 95\ \%$$

2.4.1.4 หานัยสำคัญของความแตกต่างโดยใช้ Chi-square (χ^2)

$$\chi^2 = \frac{(|PD - ND| - 1)^2}{PD + ND}$$

$$= (|0 - 4| - 1)^2/(0+4)$$

$$= 2.25$$

A Chi-square value น้อยกว่า 3.84 แสดงว่า อัตราส่วนระหว่างวิธีทางเลือกที่ให้ผลบวกและวิธีมาตรฐานที่ให้ผลบวกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว พรรณชรินทร์ ศรัทธา
วัน เดือน ปีเกิด	11 กรกฎาคม 2522 ที่ จ.ชลบุรี
ประวัติการศึกษา	2544 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	นักวิชาการ 5 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประจำศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา จ.สมุทรปราการ - งานด้านทดสอบทางจุลชีววิทยาในอาหาร เครื่องดื่ม ภาชนะสัมผัสอาหาร เครื่องสำอาง สีอุตสาหกรรม - งานทีมวิชาการในระบบ ISO 17025

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้