ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

(Isolation and Identification of *Salmonella* in Meat and Meat products)

โดย

นางสาวศิริขวัญ	วงษ์ราษฎร์	รหัสประจำตัว 39044452
นายสมชาย	สุพลวงศ์	รหัสประจำตัว 39044453

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..........(ลายมือชื่อ).......... ....๓ / มี.ค. / ๔๒.... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(อ. นิตยา พิชะภักดิ์)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

..........(ลายมือชื่อ)..........

(ผศ.ดร. ...)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่............เดือน............................พ.ศ. ....

ปพ
ด 451ก
2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16660

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

(Isolation and Identification of *Salmonella* in Meat and Meat products)

T096722

โดย

นางสาวศิริขวัญ วงษ์ราษฎร์ รหัสประจำตัว 39044452
นายสมชาย สุพลวงศ์ รหัสประจำตัว 39044453

ปพ.
ศ451ก
25A2
เลขหมู่.......
เลขทะเบียน 96722
วัน.เดือน.ปี 04 JUN 2009

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)
พ.ศ. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิริขวัญ วงษ์ราษฎร์ และ สมชาย สุพลวงศ์ . 2542 : การตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Isolation and Identification of *Salmonella* in Meat and Meat products). ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา . 45 หน้า

จากการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ได้แก่ เนื้อไก่ เครื่องในไก่ เนื้อหมู เนื้อวัว ไข่ไก่ แหนม เบคอน หมูยอ ไส้กรอกไก่ และ ลูกชิ้นเนื้อวัว จำนวน 40 ตัวอย่างที่จำหน่ายตามร้านค้าและตลาดสดในบริเวณตลาดหัวตะเข้ อำเภอลำประทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ ด้วยวิธีมาตรฐาน Bacteriological Analytical Manual ,1992 (BAM,1992) ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* 2 ตัวอย่างโดยพบในเนื้อหมู 1 ตัวอย่าง และในไส้กรอกไก่ 1 ตัวอย่าง เมื่อใช้ Selenite cystein broth และ Tetrathionate broth เป็น enrichment medium ตามลำดับ และตรวจยืนยันผลทางน้ำเหลืองวิทยาที่ WHO *Salmonella – Shigella* Center กองพยาธิวิทยาคลีนิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธรณสุข พบว่าเป็นเซโรวาร์ *Salmonella* Rissen ทั้ง 2 ตัวอย่างและได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อระหว่างวิธีมาตรฐาน BAM ,1992 และวิธีรวดเร็ว (ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella*ของMedvet) พบว่าทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยวิธีมาตรฐาน BAM, 1992 ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องสูงกว่าวิธีรวดเร็ว

ศิริขวัญ วงษ์ราษฎร์ (ลายมือ)

สมชาย สุพลวงศ์ (ลายมือ) | (ลายมือ) | 23 ธ.ค. 43

ลายมือชื่อนักศึกษา | ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา | วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ซึ่งได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โครงการนี้ประสบผลลุล่วงไปด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก

1. อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ในการให้คำปรึกษาและคำแนะนำ อีกทั้งยังมีความห่วงใยติดตามการดำเนินงานอย่างใกล้ชิด
2. อาจารย์อดิสร เสวตวิวัฒน์ ที่ได้กรุณาแนะนำวิธีการทดลอง การสังเกต และการตรวจเชื้อ ตลอดจนเป็นธุระในการนำเชื้อไปตรวจสอบที่ศูนย์ซัลโมเนลลา
3. อาจารย์เทียมพบ ก้านเหลือง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้ความกรุณาแนะนำและช่วยเหลือในการประมวลผลทางสถิติ
4. บริษัท เค เอ็น พี อินเตอร์เทรดแอนด์ เซอร์วิส จำกัด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อชุดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet
5. คุณพ่อและคุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในการทำโครงการนี้
6. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทดลองทุกท่านเป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ ที่นี้ด้วย ตลอดจนขออภัยอย่างสูงถ้ากระทำการใดที่ก่อให้เกิดความลำบากแก่ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ ผู้ศึกษาขออาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัยและสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั้งหลายในสากลโลก จงอำนวยความสุข ความเจริญแก่ทุกท่านเทอญ

ศิริขวัญ วงษ์ราษฎร์
สมชาย สุพลวงศ์
26 มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ช
สารบัญภาคผนวก	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
- คุณลักษณะของ Genus *Salmonella*	2
- ลักษณะการเจริญเติบโตและปฏิกิริยาชีวเคมี	3
- เกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Salmonella*	6
- การตรวจหา *Salmonella*	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	17
- วัตถุประสงค์	17
- การทดลอง	18
- เครื่องมือและอุปกรณ์	18
- อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ	19
- ตัวอย่างอาหาร	19
- วิธีการทดลอง	20
1.การตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* โดยวิธีมาตรฐาน	20
1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร และการPre-enrichment	20
1.2 Enrichment	21
1.3 Selective plating	21
1.4 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี	23
1.5 การทดสอบการตกตะกอนกับแอนติเจน	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2. การศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารด้วยชุดทดสอบ 1412 HACEPMate *Salmonella* ของMedvet 26

2.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารและการPre- enrichment 26

2.2 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* 26

3. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อ *Salmonella* โดยวิธีรวดเร็วกับวิธีมาตรฐาน 26

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 27

1.ผลการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีมาตรฐาน และผลการตรวจสอบสายพันธุ์ 27

2. ผลการการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีรวดเร็ว (1412HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet) 29

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน 31

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 32

เอกสารอ้างอิง 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า

1. ตารางแสดงความแตกต่างกันของ *Salmonella* เปรียบเทียบกับเชื้ออื่นๆใน Family Enterobacteriaceae 3
2. ตารางแสดง Species ของเชื้อสกุล *Salmonella* 6
3. การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่และเครื่องในไก่ของประเทศต่างๆ 9
4. แสดงการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเนื้อเป็ด 10
5. ตารางแสดงการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเนื้อวัว 10
6. แสดงการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเนื้อหมู 11
7. แสดงการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเนื้อเนื้อสัตว์อื่นๆ 11
8. ตัวอย่างอาหารที่ใช้เป็นอาหาร Selective enrichment สำหรับ *Salmonella* 13
9. ตัวอย่างอาหารที่ใช้เป็นอาหาร Selective plating สำหรับ *Salmonella* 14
10. วิธีการตรวจเชื้อสกุล *Salmonella* ด้วยวิธีรวดเร็ว 15
11. แสดงผลการทดลองการตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน 28
12. คุณสมบัติของเชื้อที่ส่งไปตรวจสอบ 29
13. ผลการทดลองการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีรวดเร็ว 30
14. แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ของวิธีทั้งสอง 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยลิโพโพลีแซคคาไรด์ชนิดที่เป็นEndotoxin	2
2. ลักษณะของเซลล์ *Salmonella* ที่ประกอบด้วย Somatic(O)antigen	5
3. แสดงลักษณะของ Antigen ที่สำคัญของ *Salmonella typhi* และ Vi antigen	5
4. ลักษณะชุดทดสอบของวิธี ELISA	16
5. ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังบ่มตัวอย่างอาหาร	20
6. การEnrichment ตัวอย่างอาหาร	21
7. ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง BS	22
8. ลักษณะบนอาหารแข็ง XLD	22
9. การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีลักษณะเป็นบวกของเชื้อ *Salmonella* บนอาหารแข็ง TSI	23
10. ตัวอย่างอาหารที่ใช้เป็นอาหาร Selective plating สำหรับ *Salmonella* บนอาหารแข็ง LIM	24
11.ลักษณะชุดทดสอบสอบก่อนและหลังทดสอบ	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1. ขั้นตอนของวิธีการ Phage typing	7
2. ขั้นตอนการจำแนกเชื้อด้วยวิธี Bacterocin typing	8
3. สรุปขั้นตอนการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

	หน้า
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	34
ภาคผนวก ข การลำดับรหัสตัวอย่าง	39
ภาคผนวก ค รายละเอียดข้อมูลชุดทดสอบ	40
ภาคผนวก ง การคำนวณทางสถิติ	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โรคซัลโมเนลโลซิส (Non – typhoid Salmonellosis) เป็นหนึ่งในโรคติดต่อที่ได้จากอาหาร (Foodborne disease) ซึ่งได้กลายมาเป็นหนึ่งในปัญหาสาธารณสุขที่ส่งผลต่อสุขภาพและอนามัยของประชาชนทั่วโลก จาก " ยกร่าง แผนแม่บทควบคุมโรคซัลโมเนลโลซิส ปี พ.ศ. 2542 – 2544 " กล่าวว่า โรคดังกล่าวติดต่อมาได้ทางการบริโภคอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่มีเชื้อ หรือปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรค ซึ่งจะทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเป็นส่วนใหญ่ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *Salmonella* และเนื่องจากเชื้อนี้สามารถที่จะปนเปื้อนได้ในอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเสี่ยงต่อการรับประทานอาหารที่มีเชื้อได้ จากข้อมูลของกองวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า มีการตรวจพบเชื้อในเนื้อไก่สดตามตลาดสด ตามซุปเปอร์มาร์เก็ต 72 % ในเนื้อหมูเนื้อวัว 90 % ในอาหารพร้อมปรุง 57 % ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 18.83 % และในอาหารพร้อมบริโภค 3.48 % แสดงว่ามีการปนเปื้อนเชื้อในอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทุกประเภท แต่ทว่ายังไม่มีประเทศใดในโลกที่จะยับยั้งเชื้อนี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น แต่ละประเทศจึงได้กำหนดมาตรการต่างๆมาเป็นข้อกำหนดเพื่อใช้ในการควบคุมและลดการปนเปื้อนจากเชื้อดังกล่าว

สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศที่กำลังจะพัฒนาอุตสาหกรรมการส่งออกทางด้านอาหารประเภทเนื้อสัตว์ อาหารทะเล ผลไม้ ผัก และของเล่นสุนัข ฯลฯ ซึ่งสินค้าเหล่านี้ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการหามาตรการมาเฝ้าระวังเชื้อนี้ จะช่วยทำให้ ผู้ซื้อเกิดความมั่นใจในระดับหนึ่งว่าสินค้าที่ซื้อไปนั้นมีคุณภาพและมีมาตรการในด้านความปลอดภัย ก่อให้เกิดความน่าเชื่อถือ และแสดงความจำนงที่จะสั่งซื้อสินค้าเป็นระยะเวลาหรือปริมาณที่มากขึ้น

อย่างไรก็ดี การที่จะตรวจสอบและติดตามเชื้อนี้ได้ จะต้องอาศัยวิธีในห้องปฏิบัติการซึ่งใช้เวลานาน ทำให้ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความรวดเร็ว สามารถตรวจสอบเชื้อที่ปนเปื้อนได้อย่างแม่นยำ ซึ่งการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อดังกล่าวให้มีความรวดเร็วขึ้นนี้ จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่สำคัญมาใช้ภายในเวลารวดเร็ว ทันต่อเหตุการณ์ และลดการสูญเสียที่จะตามมาได้

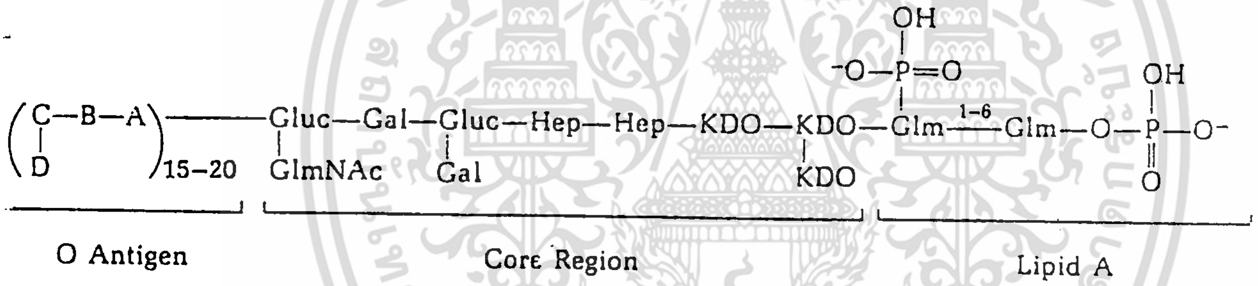
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

คุณลักษณะของ Genus *Salmonella*

Salmonella จัดอยู่ใน Family Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อน(straight rod shape) ไม่มีสปอร์ ติดสีแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ซึ่งส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาแบบรอบเซลล์ (peritrichous) ยกเว้น *Salmonella* Gallinarum และ *Salmonella* Pullorum ที่ไม่มีแฟลกเจลลา(Doyle and Montville .1997)

Salmonella มีขนาดโดยทั่วไปเท่ากับ 0.7-1.5 x 2.5 ไมโครเมตร โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโพโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccaride) ชนิดที่เป็น endotoxin ดังภาพที่1



Glm	-	Glucosamine
KDO	-	Ketodeoxyoctonic acid
Hep	-	Heptose
Gluc	-	Glucose
Gal	-	Galactose
GlmNAc	-	N-acetyl glucosamine
A,B,C,D	-	Monosaccharides such as mannose, galactose, rhamnose, fucose, glucose, abequose, and colitose. These sugars exist in a repeating sequence of 15 to 20 units of 3 or 4 sugars.

ภาพที่ 1 โครงสร้างของผนังเซลล์ของซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพจะเห็นว่า hydroxyl group อิสระของ glucosamines ใน lipid A ทุกตัวที่เชื่อมต่อกับกรดไขมันต่างชนิด (BOYD,1995)

Salmonella จัดเป็นแบคทีเรียที่มีการหายใจแบบ Facultative anaerobic แบคทีเรียสกุลนี้ส่วนมากมักไม่ค่อยทนความร้อน โดยทั่วไปเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5-47 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส (พบว่าถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้และยังพบอีกว่าในกรณีอุณหภูมิแช่แข็งจะมีผลในการทำลายเชื้อนี้น้อยมาก แต่จะมีผลในการป้องกันการเจริญหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อเท่านั้น) (Adam and Moss. 1995.)

อย่างไรก็ดี แม้ว่า *Salmonella* จะอยู่ใน Family Enterobacteriaceae แต่ทว่า ก็มีข้อแตกต่างจากแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างกันของ *Salmonella* เปรียบเทียบกับเชื้ออื่นๆใน Family Enterobacteriaceae

คุณสมบัติ	Family Enterobacteriaceae			
	Salmonella	*Shigella*	*Citrobacter*	*Edwardsiella*
Arginine dihydrolase	+ / -	-	+/-	-
Lysine decarboxylase	+	-	-	+
Ornithine decarboxylase	+	-	+/-	+
Simmon's citrate	+	-	+	-
H_2S	+	-	-/+	+
Acid from				
Lactose	-	-	+/-	-
Dulcitol	+ / -	-	-/+	-
Melibiose	+	-/+	-	-
Sorbitol	+	-/+	+	-
Xylose	+	–	+	-
Motility	+	-	+	+

ที่มา : Jean – Yves D'Aoust.**Foodborne Pathogenic Bacteria.**

<u>ลักษณะการเจริญเติบโตและปฏิกิริยาชีวเคมี</u>

ซัลโมเนลลาสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น สามารถเจริญบนอาหารแข็ง MacConKey , EMB ,SS และ DCA ได้ ลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆไป คือ จะมีลักษณะกลม ขอบเรียบ เป็นมัน ไม่มีสี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 2 มิลลิเมตร โคโลนีจะไม่ทึบและไม่โปร่งแสงยกเว้นบางสายพันธุ์ที่มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก(จาก R.F.BOYD.**General Microbiology**)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติที่สำคัญของ *Salmonella* คือ

1. KIA or TSI : Alkaline slant / acid deep, H_2S , gas	+
2. Indole	-
3. Simmon's citrate	+
4. Lysine decarboxylase	+
5. Motility	+

สำหรับคุณสมบัติของแอนติเจนนั้น พบว่า แอนติเจนของซัลโมเนลลามี 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ

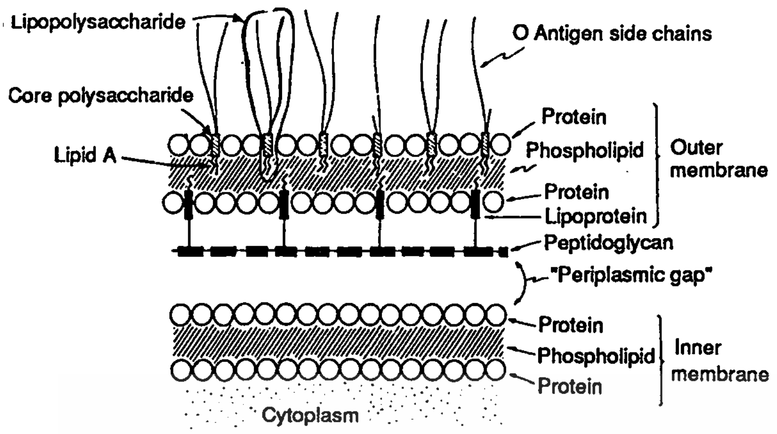
1. แอนติเจน O เป็นสารประกอบลิโพโพลีแซคคาไรด์ อยู่ในผนังเซลล์ดังภาพที่ 2 มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน (100 องศาเซลเซียส นาน 2.5 ชั่วโมง) ทนต่อแอลกอฮอล์ และกรดอ่อนๆได้ดี มีประมาณ 65 ชนิด ให้ชื่อเรียงลำดับเลขอารบิคจาก 1 2 3 4 ...ไปเรื่อยๆ

2. แอนติเจน H เป็นสารประกอบโปรตีน ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) ทั้งยังถูกทำลายได้ด้วยแอลกอฮอล์ และกรดต่างๆ ชนิดของแอนติเจนมีชื่อเรียงตามตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษ a b c ...ไปถึง z และตัวเลขอารบิค 1 2 3 5 6 7

3. แอนติเจน Vi เป็นส่วนของแคปซูล ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน (60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง)และถูกทำลายได้ด้วยกรด และ ฟีนอล แอนติเจน Vi นี้อาจบดบังแอนติเจน O ทำให้เชื้อไม่เกาะกลุ่มกันในแอนติซีรัม พบว่า เชื้อที่มีแอนติเจน Vi มักทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มีแอนติเจนนี้ ลักษณะของแคปซูลที่มีแอนติเจนตัวนี้อยู่แสดงไว้ในภาพที่ 3

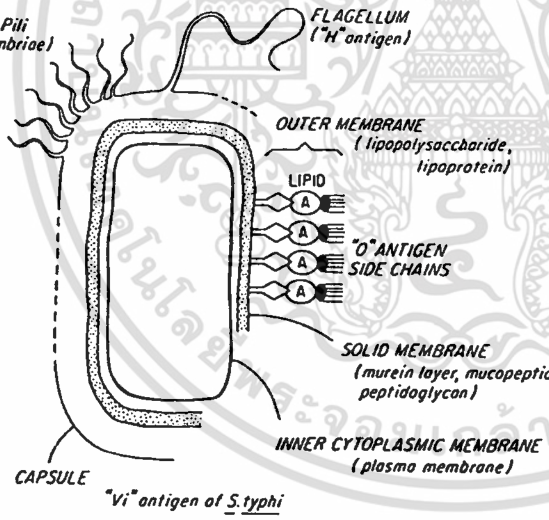
พบว่าในบางครั้ง ยีนส์สำหรับแอนติเจน O , H และ Vi อาจมีการผ่าเหล่าทำให้แอนติเจนหายไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์ของ *Salmonella* ที่ประกอบด้วย somatic (O) antigen

ที่มา : จาก *Salmonella* หน้า 195



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของแอนติเจนที่สำคัญของ *Salmonella typhi* และ Vi แอนติเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียสกุลซัลโมเนลลามักก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและในสัตว์ ซึ่งจะส่งผลแตกต่างกันออกไปตามลักษณะของโฮสต์ที่ส่งผล ซึ่งสามารถจำแนกออกได้ดังนี้

1. สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ ได้แก่ *Salmonella typhi* , *Salmonella paratyphi* เป็นต้น สายพันธุ์ดังกล่าวนี้จะไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ และเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Enteric fever
2. สายพันธุ์ที่สามารถแพร่กระจายได้ทุกหนทุกแห่ง ได้แก่ *Salmonella typhimurium* เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและในสัตว์ มักก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร อาทิเช่น โรคอุจจาระร่วง
3. สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์ ได้แก่ *Salmonella gallinarum* ที่ก่อให้เกิดโรคในหมูหรือ *Salmonella abortovis* ที่ก่อให้เกิดโรคในแกะ เป็นต้น

<u>เกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของซัลโมเนลลา</u>

1. <u>Serotyping</u>

เป็นการจำแนกเชื้อสกุลนี้โดยใช้คุณสมบัติแอนติเจนและ โดยสามารถจำแนกได้กว่า 1900 ชนิด Kauffman และ White ได้แบ่งเชื้อสกุลนี้ออกเป็น 41 กลุ่ม จาก A-Z และ 51-65 โดย O-Ag และอาศัย H-Ag, Vi แบ่งได้เป็นซีโรไทป์ต่างๆกว่า 2200 ชนิด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางแสดง species ของเชื้อสกุล *Salmonella*

Species	จำนวน serovars
<u>*Salmonella* enterica</u>	
Subsp.enterica	1,405
Subsp. salamae	471
Subsp. arizonae	94
Subsp. diarizonae	311
Subsp. houtenae	65
Subsp. indica	10
Salmonella bongori	19
<u>รวม</u>	2,375

ที่มา : ดัดแปลงจาก Foodborne Bacteria Pathogenic (1989)

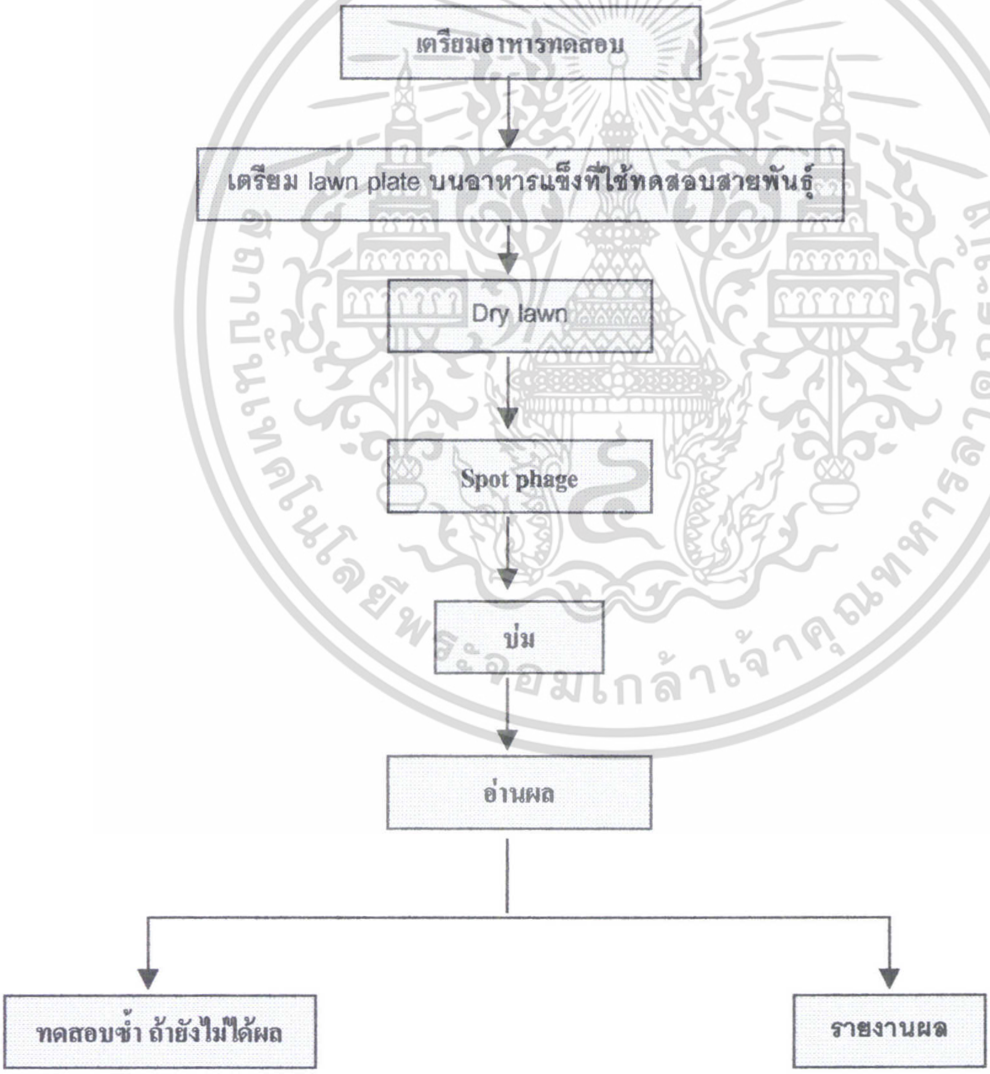
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้วิธีทาง serology ที่สำคัญคือ Widal test ใน Enteric fever ซึ่งเป็นการตรวจสอบซีรัมของผู้ป่วยว่ามีแอนติบอดีต่อซัลโมเนลลาด้วยวิธีการเกาะกลุ่ม (agglutination test) การตรวจนี้ต้องกระทำอย่างน้อยสองครั้งให้เห็นไตเตอร์ชัดเจน

2. Phage typing

วิธีนี้เป็นเทคนิคที่เพิ่งจะได้รับการพัฒนามาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซัลโมเนลลาโดยเฉพาะของในกลุ่ม Vi แอนติเจน โดยอาศัยการจำแนกแบคเทอริโอฟาจของเชื้อ ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ วิธีนี้ให้ผลการจำแนกที่ชัดเจนมากระหว่างเชื้อที่อยู่ในซีโรวาร์เดียวกัน เทคนิคนี้มีขั้นตอนดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนของวิธีการ Phage typing



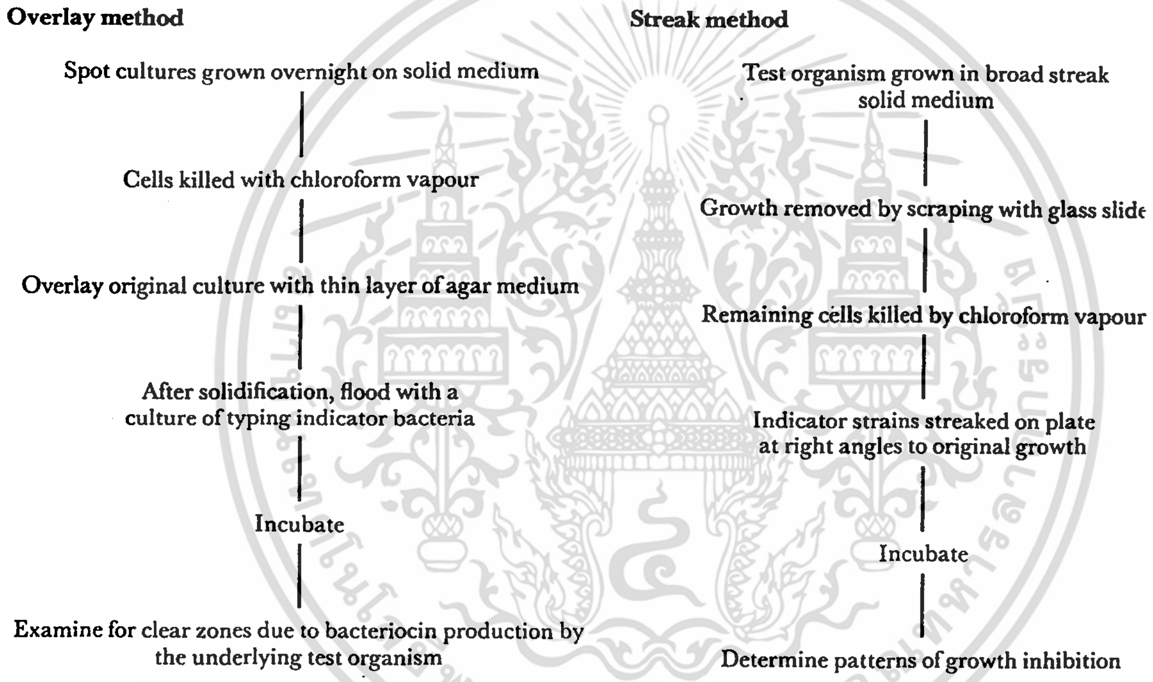
ที่มา : ดัดแปลงจาก (Guthric,1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Bacteriocin typing

แบคทีริโอซิน เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นมาจากแบคทีเรีย มีองค์ประกอบหลักของสารพิษ คือ plasmid – encoded proteinaceous อย่างไรก็ดีมีแบคทีเรียอยู่หลายชนิดเช่นกันที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ เพื่อใช้ในการยับยั้งการทำงานหรือกิจกรรมของเชื้อสายพันธุ์อื่น สำหรับขั้นตอนของการจำแนกด้วยวิธีนี้ แสดงในแผนภาพที่ 2

__แผนภาพที่ 2__ **ขั้นตอนการจำแนกเชื้อด้วยวิธี Bacteriocin typing**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารประเภทเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

อาหารประเภทเนื้อเยื่อและเลือดของสัตว์แต่ละชนิดจะให้คุณค่าทางอาหารสูงแก่ร่างกาย เพราะมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายอยู่มากมาย จึงทำให้อาหารหมู่นี้มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้ง่าย และในกรณีของซัลโมเนลลาเองก็พบว่าสามารถปนเปื้อนในอาหารหมู่นี้ได้เช่นกัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในสัตว์ปีก

สัตว์ปีกเป็นอาหารประเภทโปรตีนสูงอีกจำพวกหนึ่งที่ได้รับความนิยมและบริโภคกันทั่วไป มีหลายชนิด อาทิเช่น ไก่ เป็ด ไก่งวง ห่าน และ นก เป็นต้น

เนื้อสัตว์ปีกโดยทั่วไปมีค่า pH ประมาณ 6.2 – 6.4 ทำให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์มาก และโดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลาแล้ว อาหารหมู่นี้เป็นแหล่งที่จะพบได้มากโดยมีข้อมูลดังตารางที่ 3 – 4

ตารางที่ 3 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อไก่ และ เครื่องในไก่ของประเทศต่างๆ

ประเทศ	จำนวนตัวอย่าง			
	ปี	ทดสอบ	% ที่เป็นบวก	อ้างอิง
ออสเตรเลีย	1972 –1975	1500	27.9	672
บังคลาเทศ	1982	342	21.2	140
เบลเยียม	1973 – 1974	30	5.0	997
แคนาดา	1979 – 1984	1891	16.7	623
คิวบา	1980 – 1981	400	55.0	22
อียิปต์	1981	559	26.2	790
อังกฤษ	1979 – 1980	100	46.0	391
ฝรั่งเศส	1985	617	79.0	618
เยอรมัน	1986	400	33.4	606
กรีซ	1984	79	57.0	1156
อิรัก	1979	47	59.5	13
ญี่ปุ่น	1984 – 1985	120	49.2	361
เนเธอร์แลนด์	1976	99	73.0	1147
โปแลนด์	1970-1978		51.4	63
ซาอุดิอาระเบีย	1977 – 1980	422	12.8	774
สหรัฐอเมริกา	1979	601	36.9	416

ที่มา : ดัดแปลงจาก D'Aoust.(1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในเนื้อเป็ด

		Percentage positive/number tested			
Country	Period	Turkey	Geese	Duck	Reference
Canada	1983-1984	68.9/225	60.0/130	–[a]	623,682
Czechoslovakia	1971-1981	10.3/39,564	–	–	1004
Denmark	1978-1979	–	–	42.3/194	134
Egypt	1968-1971	–	3.3/2936	18.5/200	879
	ca. 1980	–	–	26.8/429	539
Germany (Federal Republic)	ca. 1976	–	–	56.6/53	900
Northern Ireland	1972	–	–	5.7/597	833
Poland	1973-1974	–	16.0/25	80.0/25	997

ที่มา : ดัดแปลงจาก D'Aoust.(1997)

<u>การปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ</u>

แสดงข้อมูลในตารางที่ 5 – 7

ตารางที่ 5 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในเนื้อวัว

		Number of samples		
Country	Period	Tested	Percentage positive	Reference
Bangladesh	ca. 1982	282	5.0	140
Canada	1984-1985	516	3.3	623
Czechoslovakia	1971-1980	50,699	0.2	1003
England	ca. 1976	720	4.3	784
Germany (Federal Republic)	1983	64	21.5	1188
Greece	1975	121	20.7	831
India	ca. 1975	1563	2.8	437,681
Indonesia	1982-1983	735	6.8	861
Nigeria	ca. 1981	200	3.0	804
Poland	1970-1978	NA[a]	11.4	63
Saudi Arabia	1977-1980	400	1.5	774
Sweden	1974-1978	189,285	0.2	1195
Zaire	1972-1973	301	2.7	1141

ที่มา : ดัดแปลงจาก D' Aoust.(1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในเนื้อหมู

Country	Period	Number of smaples: Tested	Number of smaples: Percentage positive	Reference
Australia	1968	200	28.5	918
	ca. 1987	100	21.0	739
Canada	1983-1984	960	5.2	332,623
Denmark	1969-1970	655	3.5	1013
	1983-1984	350	8.0	1014
Egypt	ca. 1982	80	26.0	303
England and Wales	1968-1970	16,240	6.3	1013
Greece	1975-1978	391	28.4	831,1165
Hong Kong	1976	67	21.0	188
India	ca. 1976	400	8.8	1008
Indonesia	1982-1983	50	58.0	861
Italy	1981-1983	237	43.5	218
Netherlands	1971-1972	7,756	22.3	290
	1981-1983	139	76.3	218
Northern Ireland	ca. 1973	300	7.3	700
Poland	1970-1978	NA[a]	34.7	63
Singapore	1973-1975	137	19.0	199
Sweden	1974-1978	220,283	0.4	1195
United States	ca. 1986	874	13.5	234
USSR	1981-1983	33	51.5	218
Zaire	1972-1973	265	3.4	1141

ที่มา : ดัดแปลงจาก D' Aoust.(1997)

ตารางที่ 7 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์อื่นๆ

Country	Period	Percentage positive/Number tested: Camel	Buffalo	Sheep	Goat	Horse	Reference
Australia	1976-1978	–[a]	–	–	–	17.2/250	925
Egypt	1970-1971	–	3.2/664	–	–	–	879
	ca. 1982	33.3/30	3.3/30	2.0/50	–	–	303
England	1975-1977	–	–	–	–	20.0/85	532
Germany (Federal Republic)	1983	–	–	–	–	21.1/19	1188
Greece	1975	–	–	8.1/62	–	–	831
India	ca. 1973	5.2/271	–	3.1/812	9.6/1559	–	21,541,615
	ca. 1975	–	–	5.8/69	2.2/737	–	437,681
	ca. 1979	–	–	2.0/101	1.9/618	–	1010
Indonesia	1982-1983	–	7.0/71	–	–	–	861
Iran	1974	–	–	–	4.4/1005	–	1074
Nigeria	ca. 1985	0/300	–	–	–	–	616
Saudi Arabia	1977-1980	–	–	18.6/172	18.8/16	–	774
Senegal	1974-1975	–	–	4.8/1108	3.6/1018	–	274
Singapore	1973-1975	–	–	51.5/33	–	–	199
Sudan	ca. 1970	–	–	3.5/1750	1.0/500	–	589
Turkey	1968	–	–	11.7/650	–	–	1186
United States	1973-1975	–	–	17.5/40	–	15.2/270	195,980

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : ดัดแปลงจาก D'Aoust.(1997)

การตรวจหาซัลโมเนลลา

ในการจะวินิจฉัย หรือ ตรวจแยกเชื้อซัลโมเนลลา ต้องอาศัยการตรวจเชื้อทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ ซึ่งสามารถแบ่งวิธีที่จะใช้ในการตรวจเชื้อออกเป็นสองวิธีใหญ่ ๆ คือ (อ้างอิงจาก Food Poisoning)

1. วิธีมาตรฐาน (Standard Conventional Cultural Isolation Technique)

การตรวจเชื้อด้วยวิธีนี้นั้นยังคงเป็นวิธีการที่ยังใช้อยู่ในปัจจุบัน เป็นวิธีมาตรฐานที่ยังให้ผลการทดสอบที่เป็นที่ยอมรับและมีความถูกต้อง

ขั้นตอนที่สำคัญของวิธีนี้สำหรับตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาได้ว่า ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร การเจือจาง และ การ Pre – enrichment (Pre – enrichment)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่จะช่วยให้เชื้อในตัวอย่างอาหาร ซึ่งมีปริมาณน้อยหรือเป็นเชื้อที่บาดเจ็บได้มีโอกาสปรับตัวให้แข็งแรงพร้อมที่จะเพิ่มจำนวนได้ ตามประวัติการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลานั้นแรกทีเดียวได้ใช้วิธีบ่มตัวอย่างอาหารลงใน selective enrichment medium เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปเขี่ยเพาะเลี้ยงเชื้อบน selective หรือ differential agar แล้วจึงแยกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะตามแต่ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบสมบัติทางชีวเคมี และการตกตะกอนกับแอนติเซรัม ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารโดยวิธีดังกล่าวนั้น ไม่เหมาะสมต่อการตรวจหาเชื้อในอาหารหลายชนิดเนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบของ selective enrichment medium มีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ได้รับบาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ เช่น การผ่านความร้อน การทำแห้ง การแช่แข็ง เป็นต้น จึงได้มีการแก้ไขโดยเพิ่มขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์โดยใช้ non- selective enrichment (pre- enrichment)กับอาหารที่ผ่านการแปรรูปดังกล่าว เพื่อให้เซลล์ที่บาดเจ็บอยู่นั้นแข็งแรงและเป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อ ก่อนที่จะถ่ายลงใน selective enrichment medium แล้วนำไปทดสอบต่อไป สำหรับอาหารที่ใช้ในการพรีเอ็นริชนั้น ที่นิยมใช้กันได้แก่ อาหารเหลว Lactose (Lactose broth) , อาหารเหลว Buffer peptone water เป็นต้น

1.2 การเอ็นริช (Enrichment)

เป็นขั้นตอนที่จะช่วยลดจำนวนแบคทีเรียทั่วๆไปที่อาจปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง แต่จะสนับสนุนการเจริญของเชื้อให้เพิ่มมากขึ้น อาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้แสดงไว้ในตารางที่ 8 ในการทำเอ็นริชนั้น จะเริ่มจากการถ่ายเชื้อจากขั้นตอนพรี – เอ็นริช มาใส่ในอาหารที่จะใช้ทำการเอ็นริช แล้วจึงนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปเขี่ยเชื้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ตัวอย่างอาหารที่ใช้เป็นอาหาร Selective enrichment สำหรับเชื้อซัลโมเนลลา

อาหาร	สารยับยั้ง	การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด
Tetrathionate[1]	Tetrathionate , brilliant green , ox bile	ไม่เหมาะกับการตรวจสอบสายพันธุ์ที่มาจากโฮสต์
Selenite F broth	Selsnite	เหมาะสำหรับสายพันธุ์ *S. typhi ,S dublin ,S. choleraesuis*
Selenite – cystine broth	Selenite	ซิสตีนจะเป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อทุกสายพันธุ์
Brilliant green – MacConKey broth	Brilliant green , bile salts	ไม่นิยมใช้กันเนื่องจากเหมาะสมกับ *S. choleraesuis*
RV broth	Malachite green , magnesium chloride	ไม่เหมาะสมกับการตรวจหา *S. typhi* และ *S. dublin* ,

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Gutric,1992)

[1] กรณีนี้หมายถึง Tetrathionate – brilliant green ที่ไม่ใช่ Tetrathionate มาตรฐาน

1.3 <u>การจำแนกและแยกเชื้อ (Selective plating)</u>

เป็นขั้นตอนที่ใช้แยกเชื้อจากที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ เพื่อที่จะได้นำโคโลนีที่สงสัยไปตรวจสอบต่อไป โดยอาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้อาหารที่ใช้จะประกอบด้วยสารที่จะไปยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา ซึ่งได้แสดงตัวอย่างอาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้ไว้ในตารางที่ 9

อย่างไรก็ดี ในทางปฏิบัติไม่นิยมที่จะเลือกใช้อาหารเพียงชนิดเดียวในการตรวจแยกเชื้อ เนื่องจากประสิทธิภาพของอาหารแต่ละชนิดย่อมครอบคลุมประเภทของเชื้อต่างกัน ซึ่งถึงแม้ว่าจะสามารถใช้ได้กับทุกสายพันธุ์ แต่บางครั้งก็มีข้อยกเว้น ดังนั้นจึงควรเลือกใช้อาหารอย่างน้อยสองชนิดในการทำ

1.4 <u>การยืนยันผลโดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical screening)</u>

เป็นขั้นตอนที่ใช้ลักษณะทางชีวเคมีและเมตาบอลิซึมต่างๆ มาเป็นตัวช่วยในการทดสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อที่ทดสอบจริงๆ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดย่อมจะมีปฏิกิริยาทางชีวเคมีและเมตาบอลิซึมเฉพาะตัว

1.5 <u>การทดสอบเพื่อหาสายพันธุ์ของเชื้อ (Serotyping)</u>

เป็นการใช้เทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยาและอิมมูนวิทยามาเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในขั้นตอน Selective plating สำหรับซัลโมเนลลา

อาหารแข็ง	คุณสมบัติ		
	สารยับยั้งในอาหาร	ระบบที่ตรวจสอบ	การใช้งานและข้อจำกัด
Brilliant green	Brilliant green agar	การเฟอร์เมนต์แลคโตสหรือซูโครส	นิยมใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ไม่เหมาะกับ *S. typhi*
Deoxycholate – citrate	Deoxycholate	การเฟอร์เมนต์แลคโตสหรือซูโครส	มีประสิทธิภาพต่ำ
DCLS	Deoxycholate	การเฟอร์เมนต์แลคโตสหรือซูโครส และการสร้าง H_2S	แบคทีเรียในกลุ่ม *Proteus* ก็เจริญได้
Salmonella – Shigella	Brilliant green agar , bile salts	การเฟอร์เมนต์แลคโตสและการสร้าง H_2S	สามารถใช้ได้กับอาหารหลายชนิด
Xylose – lysine deoxycholate	Deoxycholate	การเฟอร์เมนต์แลกโตส , ไซโลส , ซูโครส และการสร้าง H_2S	มีประสิทธิภาพต่ำ

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Gutric,1992)

2. <u>วิธีการตรวจเชื้อแบบรวดเร็ว (Rapid Cultural Method)</u> (อ้างอิงจาก BAM 7th)

เนื่องจากวิธี Conventional method ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารนั้นมีข้อจำกัดหลายประการ ดังนี้

1.ใช้เวลาในการตรวจนานมากกว่าจะทราบผล (ประมาณ 5 วัน) ซึ่งในทางปฏิบัติไม่อาจจะรอจนถึงเวลานั้นได้ทำให้ส่วนใหญ่แล้ว ผลิตภัณฑ์อาหารมักผ่านไปถึงมือผู้บริโภคก่อนที่จะทราบผลการตรวจวิเคราะห์

2. การทดสอบทางชีวเคมีต้องทำหลายปฏิกิริยา ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและพื้นที่ในการทำงานมาก

ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ เชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีรวดเร็วขึ้นดังแสดงในตารางที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 วิธีการตรวจเชื้อสกุล *Salmonella* ด้วยวิธีรวดเร็ว

Rapid screening method			AOAC Section number
Generic name	Trade name	Manufacture	
Fluorescent antibody	-	-	975.54
Hydrophobic grid membrane Filter	ISO-GRID	QA LAB. Ltd.	991.12
DNA hybridization	GENE-TRAK *Salmonella* assay	GENE-TRAK Systems,Inc.	990.13
Colorimetric monoclonal Enzyme immunoassay Immunodiffusion	*Salmonella* - Tek	Organon Teknika Corp.	986.35
Automated condutance	1-2 Test	Biocontrol systems, Inc.	989.13
	Malthus microbal detection system.	Malthus Instruments,Ltd.	991.38

ที่มา : BAM 7th.

ซึ่งสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็วดังที่แสดงไว้นั้น แต่ละวิธีก็มีความเหมาะสม ความถูกต้อง และความรวดเร็วต่างกัน

ตัวอย่างวิธีที่รวดเร็วในการตรวจเชื้อซัลโมเนลลา

2.1 Hydrophobic grid membrane filtration (HGMF)

ในช่วงทศวรรษ 1970s หน่วยงานอาหารและยาของประเทศแคนาดา (Health Protection Branch) โดยฝ่ายประกันคุณภาพที่เมืองโตรอนโต ได้พัฒนาชุดตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร Hydrophobic grid membrane filtration หรือมีชื่อทางการค้าว่า ISO – GRID

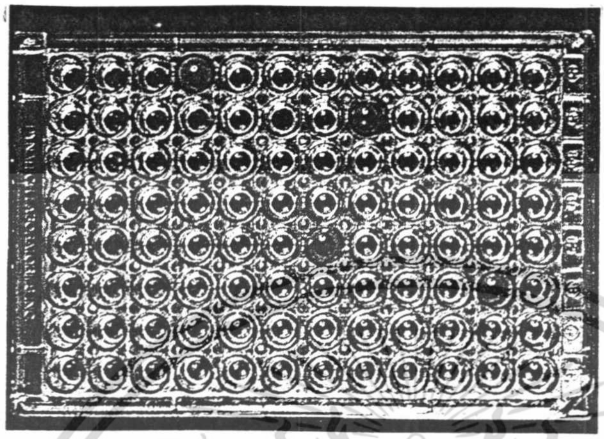
Hydrophobic grid membrane filtration หรือ HGMF ก็คือ แผ่นเมมเบรนแต่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมแทนที่จะกลมเหมือนกับแผ่นเมมเบรนที่ใช้กันทั่วไป แผ่นกรองนี้ถูกแบ่งเป็นตารางรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสด้วยวัสดุที่เป็นสารพวกไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เพื่อทำหน้าที่เป็นช่องแบ่งไม่ให้เซลอื่นเจริญเข้ามาทับถมกัน ทำให้นับได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆแทนที่จะเป็น 2 หรือ มากกว่า

ข้อดีของวิธีนี้ คือสามารถครอบคลุมปริมาณเซลล์ได้มากถึง 3 log cycle อันเป็นการลดขั้นตอนการเจือจางเชื้อให้ลงมาอยู่ในระดับที่ตรวจนับได้ อีกทั้งในแต่ละเมมเบรนมีช่อง growth comportment รูปจัตุรัสเล็กๆอยู่ 1600 ช่อง ทำให้สามารถคำนวณ MPN ได้อย่างมีประสิทธิภาพและอัตโนมัติเนื่องจากมีไมโครโปรเฟสเซอร์ทำการประมวลผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Immunological หรือ Immunoimmobilisation

2.2.1 Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีทางอิมมูนวิทยา มีลักษณะ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะชุดทดสอบของวิธี ELISA

วิธีนี้จะเป็นการใช้เอนไซม์ไปจับกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี โดยมี polystyrene เป็น solid phase และเคลือบด้วยแอนติเจนและมักบ่มกับแอนตีซีรัม จากนั้นจะมีการล้างและทำปฏิกิริยากับ enzymes – labeles anti – immunoglubolin แล้วจึงทำการล้างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในหลอดจะถูกวิเคราะห์เพื่อใช้บ่งบอกปริมาณแอนติบอดีในซีรัมเริ่มต้น เอนไซม์ที่มักจะใช้กัน คือ horseradish peroxidase ซึ่งทดสอบได้โดยการที่ทำปฏิกิริยากับhydrogen peroxide จากนั้นจำนวนของเอนไซม์จะถูกวัดโดยวิธี colorimetric การทดสอบวิธีนี้นั้น ในทางอาหารมักใช้ตรวจสอบท็อกซิน หรือสารพิษของจุลินทรีย์ ตลอดจนใช้ทดสอบแอนติบอดีของ endotoxin ของแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับหลักการของวิธี Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุประสงค์

1.เพื่อตรวจหาเชื้อสกุลซัลโมเนลลาในอาหารประเภท เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในบริเวณตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ โดยใช้วิธีมาตรฐานตาม Bacteriological Analytical Manual 7th edition (1992)

2.เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธีรวดเร็ว (ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet) เปรียบกับวิธีเทียบกับวิธีมาตรฐาน (BAM, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96722

การทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อและหลอดทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. ปิเปตขนาด 1 มล. และ 10 มล.
3. ขวดบรรจุ Trypticase Soy Broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มล. และ 100 มล.
5. บีกเกอร์ขนาด 50 มล., 400 มล., 600 มล. และ 1000 มล.
6. กรรไกร
7. กระบอกน้ำกลั่น
8. กระดาษชั่งสาร
9. กระบอกตวงขนาด 250 มล. และ 1000 มล.
10. มีด
11. ปากคีบ
12. ช้อนตักสาร
13. แท่งแก้วคน
14. เข็มเขี่ยเชื้อ
15. ลูป
16. ลูกยาง
17. ที่วางหลอดทดลอง
18. สไลด์
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์
20. เครื่องชั่งที่สามารถอ่านค่าได้ทศนิยมสองตำแหน่ง
21. ตู้เขี่ยเชื้อ
22. ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส
23. เครื่องวัดพีเอช
24. หม้อนึ่งความดัน (ออโตเคลป)
25. กระดาษทิชชู
26. สำลี
27. ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet จำนวน 40 ชุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาทดสอบ</u>

1. อาหาร Pre – enrichment เช่น อาหารเหลว Trypticase soy
2. อาหาร Enrichment เช่น อาหารเหลว Selenite cystine (SC) และ อาหารเหลว Tetrathionate (TT)
3. อาหาร Selective plating เช่น อาหารแข็ง Bismuth sulfite (BS agar) และอาหารแข็ง Xylose – lysine desoxycholate (XLD agar)
4. อาหารสำหรับทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี เช่น อาหารแข็ง Triple sugar iron (TSI agar) และ อาหาร Lysine indole motility (LIM medium)
5. อาหารสำหรับถ่ายเชื้อสำหรับส่งไปตรวจสอบ เช่น อาหารแข็ง Trypticase soy
6. *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum
7. *Salmonella* polyvalent flagella (H) antiserum
8. น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซนต์ปราศจากเชื้อ
9. น้ำยา KOVAC

<u>ตัวอย่างอาหาร</u>

1. เนื้อไก่
2. เครื่องในไก่
3. เนื้อหมู
4. เนื้อวัว
5. แหนม
6. ไส้กรอกไก่
7. เบคอน
8. หมูยอ
9. ลูกชิ้นเนื้อวัว
10. ไข่ไก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำตัวอย่างอาหารทั้ง 10 ชนิด (เนื้อไก่ เครื่องในไก่ เนื้อหมู เนื้อวัว แหนม ไส้กรอกไก่ เบคอน หมูยอ ลูกชิ้นเนื้อวัว ไข่ไก่) มาทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี

1. การตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* โดยวิธีมาตรฐาน (อ้างอิงจากBAM 7th.และ AOAC 14th.)

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร และ การ Pre – enrichment มีขั้นตอนดังนี้

1.1.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

1.1.1.1 ชั่งตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ 25 กรัม

1.1.1.2 ใส่ลงในอาหารเหลว Trypticase soy ปริมาตร 225 มล. ดังภาพที่ 5

1.1.1.3 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

1.1.2 ตัวอย่างไข่ไก่

1.1.2.1 ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดบริเวณเปลือกไข่ให้ทั่ว

1.1.2.2 ตอกไข่ใส่ภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.2.3 ตีหรือคนแรงๆเพื่อให้ไข่ขาวและไข่แดงผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.1.2.4 ปิเปตไข่จากข้อที่ 1.1.2.3 ปริมาตร 25 มล. ใส่ลงในอาหารเหลว Trypticase soy ปริมาตร 225 มล.

1.1.2.5 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

<u>ภาพที่ 5</u> ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนและหลังบ่มตัวอย่างอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16660

1.2 Enrichment มีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 ปิเปตตัวอย่างอาหารแต่ละชนิดที่ได้จากข้อที่ 1.1 มาอย่างละ 1 มล.

1.2.2 ใส่ลงไปในอาหารเหลว Selenite cystine (SC) ปริมาตร 10 มล.

1.2.3 เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

1.2.4 ทำซ้ำอีกครั้ง แต่เปลี่ยนจากอาหาร Selenite cystine (SC) เป็นอาหาร Tetrathionate (TT) ดังภาพที่ 6

ภาพที่ 6 การEnrichmentตัวอย่างอาหาร

1.3 Selective plating มีขั้นตอนดังนี้

1.3.1 นำเชื้อที่บ่มไว้ในขั้นตอนที่ 1.2 มาลากบนอาหารแข็ง Bismuth sulfite (BS agar) และ อาหารแข็ง Xylose – lysine desoxycholate (XLD agar)

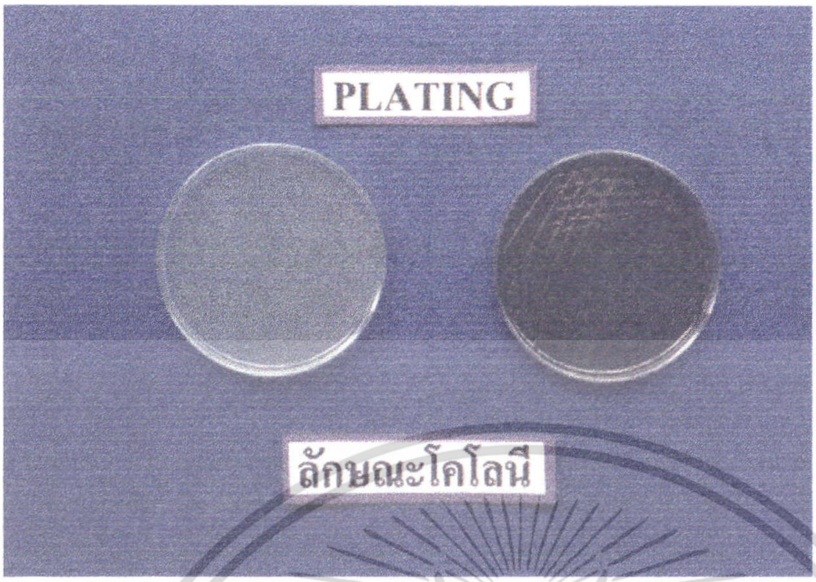
1.3.2 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

อาหารแข็ง Bismuth sulfite : ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จะมีสีดำเป็นมัน หรือ มีลักษณะใส และโคโลนีมีขนาดเล็ก ดังภาพที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง BS

อาหารแข็ง Xylose – lysine desoxycholate : ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จะมีสีดำเป็นมัน หรือ มีลักษณะใสสีชมพู และมีขนาดเล็ก ดังภาพที่ 8

ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง XLD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี มีขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การทดสอบปฏิกิริยาบนอาหารแข็ง Triple sugar iron

1.4.1.1 นำเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จากขั้นตอนที่ 1.3 มาแทงลงไปในอาหารแข็ง Triple sugar iron จนถึงก้นหลอด แล้วลากขึ้นมาบนผิวหน้า

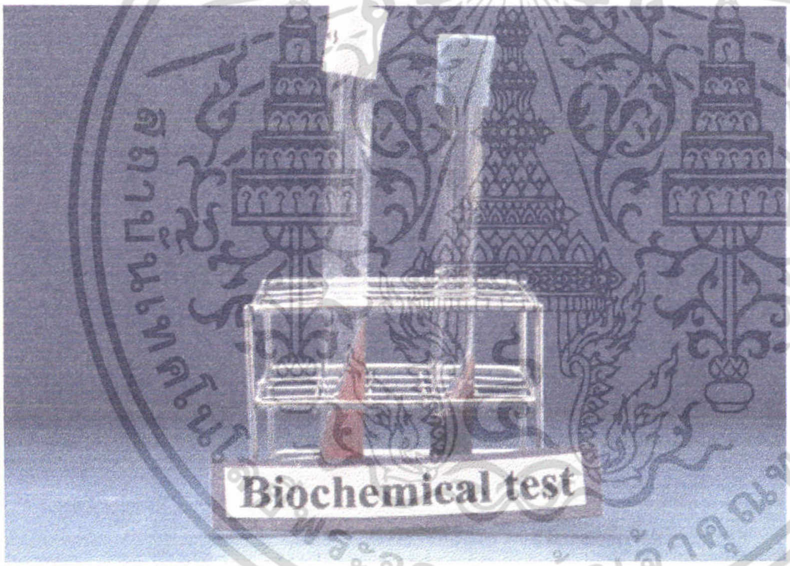
1.4.1.2 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

การอ่านผล : ผลบวกเมื่อ

บริเวณผิวหน้าอาหาร (slant) – เป็นด่าง (alkaline) มีสีชมพูบานเย็น ดังภาพที่

บริเวณก้นหลอด (butt) – เป็นกรด (acid) มีสีเหลือง

การผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ – ถ้ามีจะเห็นตะกอนสีดำที่ก้นหลอดอาหาร ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีลักษณะเป็นบวกของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร แข็ง TSI
ซ้าย : ก่อนทดลอง ขวา : หลังทดลอง

1.4.2 การทดสอบปฏิกิริยาบนอาหาร Lysine indole motility

1.4.2.1 นำเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็นโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* จากขั้นตอนที่ 1.3 มาจุ่มลงไปในอาหาร Lysine indole motility โดยจุ่มลงไปตรงๆแล้วดึงขึ้น ไม่ต้องเขย่าหรือแกว่ง

1.4.2.2 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

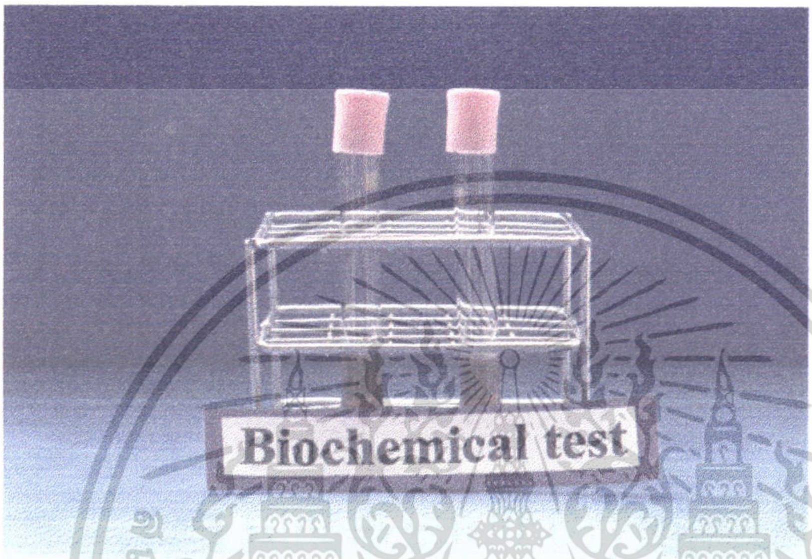
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การอ่านผล : ผลบวกเมื่อ

lysine – สีม่วง ดังภาพที่ 14

indole – สีแดง ภายหลังจากที่หยดน้ำยา KOVAC

motility – อาหารจะขุ่นทั้งหลอด



ภาพที่ 10 การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีลักษณะเป็นบวกของเชื้อ *Salmonella* บนอาหาร LIM ซ้าย : ก่อนทดลอง ขวา : หลังทดลอง

1.5 การทดสอบการตกตะกอนกับแอนติเจน

1.5.1 ทำ suspension ด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ปริมาณ 2 มล.

1.5.2 หยด suspension ลงบนสไลด์ 3 หยด ห่างกันพอสมควร

1.5.3 หยด *Salmonella* polyvalent somatic (O) antiserum ลงใน suspension หยดแรก และหยด*Salmonella* polyvalent flagella (H) antiserum ลงใน suspensionหยดที่สอง

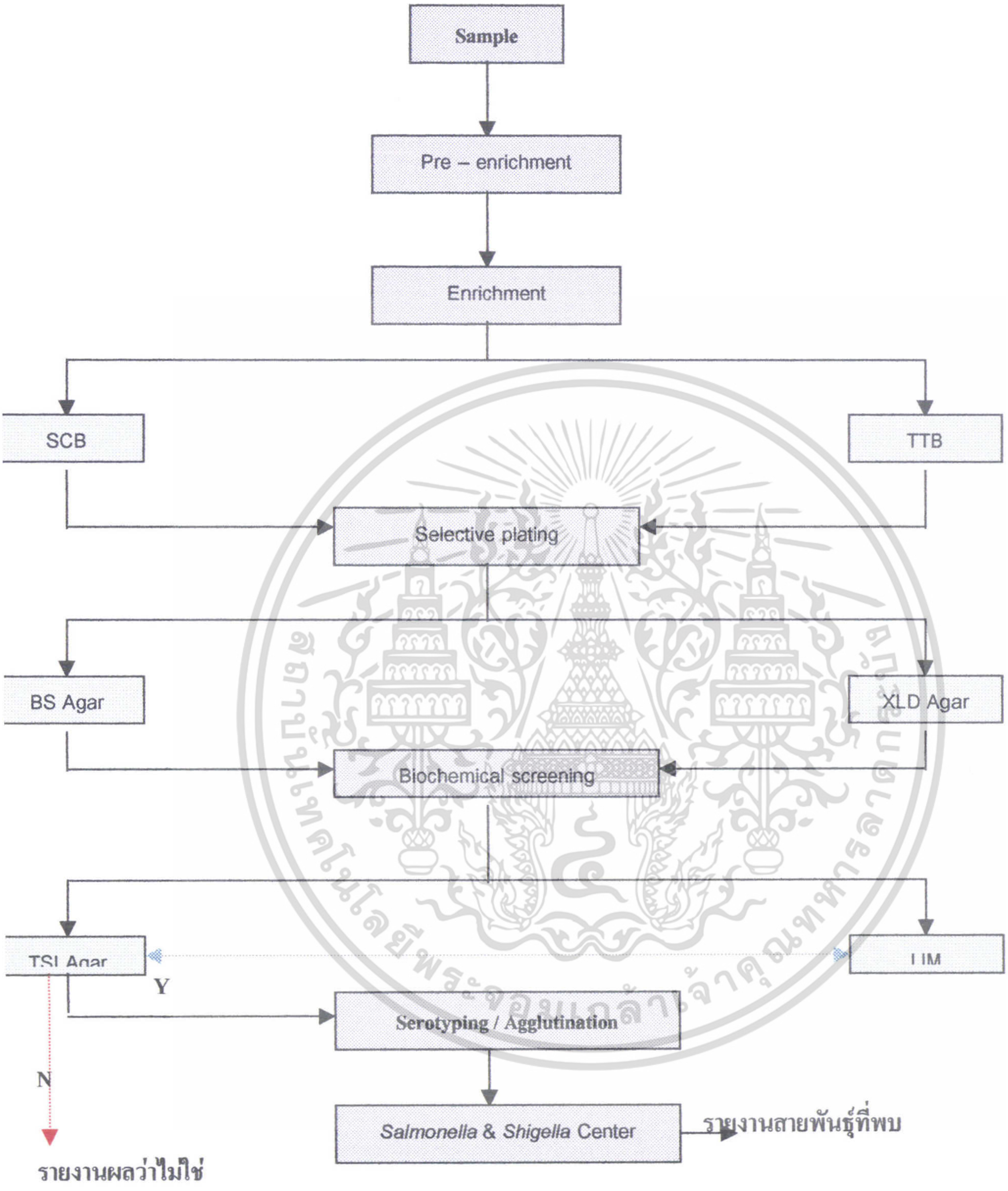
1.5.4 เอียงสไลด์ไปมา สังเกตการตกตะกอน (agglutination)

การอ่านผล : ผลบวกเมื่อ

ในหยดที่มี antiserum : มีการตกตะกอน

ในหยดที่ไม่มี antiserum : ไม่เกิดการตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพที่ 3 สรุปขั้นตอนการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหารโดยใช้ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet มีขั้นตอนดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารและการPre - enrichment

จะใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐานเพื่อที่จะได้ตัวอย่างที่เป็นลักษณะเดียวกัน

2.2 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella*

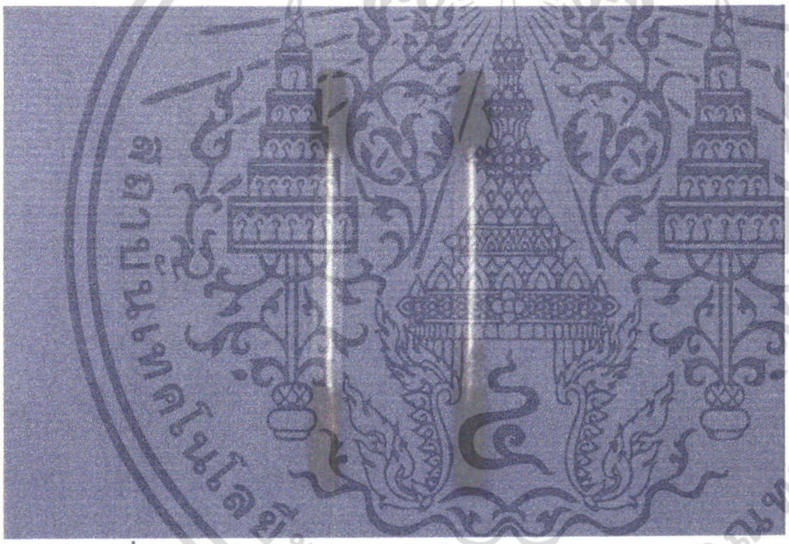
2.2.1 นำชุดทดสอบในส่วนของก้านสำลีไปจุ่มในอาหารเหลว Trypticase soy จากขั้นตอนที่ 1 ภายหลังจากที่ได้บ่มไว้แล้ว 18 – 24 ชั่วโมง

2.2.2 นำก้านสำลีที่จุ่มตัวอย่างอาหารแล้วมาใส่ลงในหลอดทดสอบ

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

การอ่านผล : ผลบวกเมื่อ

ชุดทดสอบ - เปลี่ยนเป็นสีดำ ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ลักษณะชุดทดสอบก่อน (ซ้าย) และหลังทดสอบ (ขวา)

3.การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธีรวดเร็วกับวิธีมาตรฐาน

นำผลจากการตรวจ*Salmonella*ที่ใช้วิธีมาตรฐานกับวิธีรวดเร็ว(ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet) มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ ไค – แสควร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1.<u>ผลการศึกษาการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีมาตรฐาน</u>

จากการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ในบริเวณตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ รวมทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบด้วยวิธีการ pre-enrichment enrichment selective plating การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ตลอดจนขั้นตอนการทดสอบการตกตะกอนของเชื้อ *Salmonella* กับ antiserum พบว่าผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* พบในตัวอย่างอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ ไส้กรอกรหัส 4G และเนื้อหมูรหัส 4C ซึ่งให้ผลเป็นบวก แสดงว่าในผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดนี้มีเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่มาก ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 11 ขณะที่ไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างชนิดอื่นๆที่เหลืออีก 38 ตัวอย่าง จะให้ผลเป็นลบ ซึ่งการปนเปื้อนในไส้กรอกน่าจะเกิดขึ้นภายหลังกระบวนการผลิต เนื่องจากในกระบวนการผลิตไส้กรอกใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อ *Salmonella* จะถูกทำลายหมดเนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 5 – 47 องศาเซลเซียส หรืออาจเกิดจากกระบวนการผลิตให้ความร้อนไม่เพียงพอทำให้มีอัตราการแพร่ของความร้อนไปยังใจกลางของอาหารช้า ทำให้ทำลายเชื้อ *Salmonella* ไม่หมดมีการ under process หรือเกิดมาจากการใช้ความร้อนที่สูง แต่ว่าเวลาในการ holding ไม่พอทำให้เชื้อ *Salmonella* หลงเหลืออยู่ สำหรับการปนเปื้อนในเนื้อหมูน่าจะเกิดมาจากในกระบวนการผลิตในโรงฆ่าสัตว์ เช่น การปนเปื้อนจากการใช้เครื่องมือ หรืออุปกรณ์ในการฆ่าร่วมกัน การใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ หรือว่าบริเวณที่ทำการผลิตไม่สะอาดพอทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย หรือเกิดจากการขนส่งจากบริเวณการผลิตไปจำหน่ายยังสถานที่ต่างๆ หรืออาจมีสาเหตุมาจากทางด้านสุขวิทยาส่วนบุคคล เช่น แม่ค้าในตลาดใช้อุปกรณ์ในการหั่นหรือสับไม่สะอาด ทำให้มีการปนเปื้อน หรือจากการจับหรือสัมผัสกับเนื้อหมูโดยแม่ค้า ซึ่งโดยปกติเชื้อ *Salmonella* มักจะปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ดังนั้นควรแยกเก็บวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารไว้คนละที่ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากวัตถุดิบมายังผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลการทดลองการตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่าง		ผลการตรวจวิเคราะห์*	ตัวอย่าง		ผลการตรวจวิเคราะห์*
ลำดับที่	รหัส	-	ลำดับที่	รหัส	-
1	1E	-	21	1B	-
2	2E	-	22	2B	-
3	3E	-	23	3B	-
4	4E	-	24	4B	-
5	1I	-	25	1C	-
6	2I	-	26	2C	-
7	3I	-	27	3C	-
8	4I	-	28	4C	+
9	1F	-	29	1A	-
10	2F	-	30	2A	-
11	3F	-	31	3A	-
12	4F	-	32	4A	-
13	1G	-	33	1D	-
14	2G	-	34	2D	-
15	3G	-	35	3D	-
16	4G	+	36	4D	-
17	1J	-	37	1H	-
18	2J	-	38	2H	-
19	3J	-	39	3H	-
20	4J	-	40	4H	-

หมายเหตุ * + หมายถึง ตรวจพบเชื้อ *Salmonella*

- หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ผลการตรวจสอบสายพันธุ์</u> (อ้างอิงจากการตรวจสอบโดย ศูนย์ *Salmonella & Shigella*)

จากการทำการทดลองตรวจหาเชื้อ*Salmonella* กับตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบซึ่งผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังนี้คือ pre – enrichment enrichment selective plating การทดสอบสมบัติชีวเคมี และการทดสอบการตกตะกอนของเชื้อ *Salmonella* กับ antiserum จะพบว่าตรวจพบ *Salmonella* ในไส้กรอกไก่ และเนื้อหมู ทั้งสองตัวอย่างให้ผลเป็นบวกในการทดสอบสมบัติชีวเคมี และการตกตะกอนซึ่งสรุปผลว่าใช่เชื้อ *Salmonella* ดังแสดงในตารางที่ 12 และจากการนำไปตรวจยืนยันผลทางน้ำเหลืองวิทยาเพื่อการตรวจสอบสายพันธุ์ที่ WHO *Salmonella Shigella* Center กองพยาธิวิทยาคลีนิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณะสุข พบว่าเป็นเซโรวาร์ *Salmonella* Rissen type c ทั้ง 2 ตัวอย่าง และจากการที่ตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ พบว่าตัวอย่างที่พบเชื้อนั้นเป็นคนละชนิดกัน แต่กลับตรวจพบเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งถ้ากล่าวถึงในแง่ของระบาดวิทยาแล้ว แสดงว่า เกิดการระบาดของเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ดังกล่าวขึ้นในบริเวณหัวตะเข้ และแม้ว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวจะไม่ใช่สายพันธุ์ที่ก่ออันตรายร้ายแรง แต่อย่างไรก็ดีถ้าได้รับเชื้อดังกล่าวในปริมาณมาก ก็อาจจะทำให้เสี่ยงต่อการเป็นโรคอุจจาระร่วงได้ ดังนั้น ในการจะบริโภคอาหารจำพวกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ จึงควรที่จะต้องผ่านขบวนการที่จะสามารถทำลายหรือลดปริมาณเชื้อลงเสียก่อน เพื่อความปลอดภัย

ตารางที่ 12 คุณสมบัติของเชื้อที่ส่งไปตรวจสอบ

ตัวอย่าง		ข้อมูลการทดลอง						สรุป
รหัส	ชนิด	Pre – en.	Enrich.	Plating	Biochem. test		Agglutination	
					TSI	LIM		
4GB3	ไส้กรอกไก่	TSB	SCB	XLD	+	+	+	ใช่
4CA3	เนื้อหมู	TSB	TTB	XLD	+	+	+	ใช่

หมายเหตุ * รายละเอียดการให้รหัสแสดงในภาคผนวก ข

<u>2. ผลการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีรวดเร็ว(ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet)</u>

จากการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยใช้ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet จะพบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 40 ตัวอย่าง จะพบตัวอย่างที่พบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 32 ตัวอย่าง (ซึ่งในจำนวนนี้มีตัวอย่างรหัส 4G และ 4C รวมอยู่ด้วย) และมีตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 8 ตัวอย่างถ้าแสดงผลว่าเป็นบวก แสดงว่าพบเชื้อ *Salmonella* และถ้าแสดงผลว่าเป็นลบแสดงว่าไม่พบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลการทดลองการตรวจเชื้อด้วยวิธีรวดเร็ว

ตัวอย่าง		ผลการตรวจวิเคราะห์ *	ตัวอย่าง		ผลการตรวจวิเคราะห์ *
ลำดับที่	รหัส		ลำดับที่	รหัส	+
1	1E	+	21	1B	+
2	2E	-	22	2B	+
3	3E	-	23	3B	+
4	4E	-	24	4B	+
5	1I	+	25	1C	+
6	2I	+	26	2C	+
7	3I	-	27	3C	+
8	4I	+	28	4C	+
9	1F	-	29	1A	+
10	2F	+	30	2A	+
11	3F	+	31	3A	+
12	4F	+	32	4A	+
13	1G	+	33	1D	+
14	2G	-	34	2D	+
15	3G	+	35	3D	+
16	4G	+	36	4D	+
17	1J	+	37	1H	+
18	2J	+	38	2H	-
19	3J	+	39	3H	-
20	4J	+	40	4H	+

หมายเหตุ * + หมายถึง ตรวจพบเชื้อ *Salmonella*

- หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน

จากการนำผลการทดลองจากข้อ 1 และข้อ 2 ซึ่งเป็นการตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานกับการตรวจเชื้อด้วยวิธีแบบรวดเร็วซึ่งใช้ตัวอย่างเดียวกัน แล้วนำผลมาเปรียบเทียบกันพบว่าผลการตรวจเชื้อแบบรวดเร็วให้ผลเป็นบวกแสดงว่ามีการพบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งมีจำนวน 32 ตัวอย่างและให้ผลเป็นลบแสดงว่าไม่มีการพบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งมีจำนวน 8 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 14 และการตรวจเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานพบว่าผลการทดลองเป็นบวกแสดงว่ามีการพบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งพบจำนวน 2 ตัวอย่างและให้ผลเป็นลบ ไม่มีการพบเชื้อ *Salmonella* จำนวน 38 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาประเมินผลพบว่า ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันที่ระดับองศาอิสระ เท่ากับ 1 และระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายความว่า ผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* โดยวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็ว

ผลการตรวจเชื้อ	วิธีวิเคราะห์	
	รวดเร็ว	มาตรฐาน
+	32	2
-	8	38

การที่ผลการวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบ 1412 HACEP Mate *Salmonella* ของ Medvet ต่างกับวิธีมาตรฐานเนื่องจากชุดทดสอบนี้นอกจากให้ผลบวกกับเชื้อใน *Salmonella* แล้วยังให้ผลบวกกับเชื้อในกลุ่ม *Proteus* ด้วย (ภาคผนวก ค) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีเชื้อ *Proteus* ปนเปื้อนอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. จากการทดลอง พบว่า จากตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบทั้งหมด 40 ตัวอย่าง มีเพียง 2 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ ตัวอย่างดังกล่าว คือ ตัวอย่างไส้กรอกไก่ (4GB2) คือการทดสอบครั้งที่4โดยใช้ตัวอย่างไส้กรอกไก่ ซึ่งในขั้นตอน Enrichment ใช้อาหารเหลว Selenite Cystein และขั้นตอน Platingใช้อาหารแข็ง XLD และตัวอย่างเนื้อหมู (4CA2) หมายความว่า เป็นการทดสอบครั้งที่ 4 ใช้ตัวอย่างเนื้อหมู ซึ่งในขั้นตอน Enrichment ใช้อาหารเหลว Tetra thionate และขั้นตอน Plating ใช้อาหารแข็ง XLD ซึ่งรายละเอียดการลำดับรหัสตัวอย่างจะดูได้จากภาคผนวก ข
2. สายพันธุ์ของเชื้อที่พบในตัวอย่างอาหารทั้งสองคือ *Salmonella* Rissen serotype c
3. จากการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐานโดยใช้การทดสอบทางสถิติแบบไค – สแควร์ ที่ระดับ degree of freedom เท่ากับ 1และระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หรือกล่าวว่า ทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน แสดงว่า ผลการทดสอบที่ได้จากทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกัน
4. จากการเทียบมาตรฐานวิธีการทดสอบแบบรวดเร็วทำให้ทราบว่า วิธีการแบบรวดเร็วมีโอกาสเกิด False positive (93.75 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่เกิด False negative เลย (0 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าชุดทดสอบนี้สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องจาก วัตถุประสงค์ของการใช้ชุดทดสอบ คือ ตรวจหาแนวโน้มของการเจอเชื้อ และจากการทดลองก็เห็นแล้วว่า ชุดทดสอบดังกล่าวสามารถบอกแนวโน้มของการเจอเชื้อได้เป็นอย่างดี แม้ว่าความถูกต้องในการเจอเชื้อที่ต้องการยังไม่สูงนัก ถ้าต้องนำมาใช้ในงานประจำอาจจะเป็นการสิ้นเปลืองได้

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดร.ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และ ดร. ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์.2536.**Rapid method และ Automation สำหรับจุลชีววิทยาทางอาหาร**. กทม. ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. บทปฏิบัติการ จุลชีววิทยาขั้นสูง (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 1). ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์.“**สถานการณ์: งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย.**” 1-21. กรุงเทพมหานคร. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

Adams.M.R. and Moss.M.O.1995. **Food Microbilology**.UK:The Royal Society of Chemistry.

Association of Official Analytical Chemist. 1984. Official method of analysis.14th.ed. Association of Analytical Chemist. Arlington , Verginia.

Atlas. R.M. 1946. **Handbook of Media for Environmental Microbiology.** USA: CRC Press,Inc.

Boyd. F.R. 1995. **General Microbiology**. MARCELL DEKKER, INC. USA.

D’Aoust.1997. **Salmonella**. USA:CRC Press, Inc

Doyle.MP.1989. **Foodborne Bacterial Pathogens**: MARCELL DEKKER, INC. USA.

Doyle.MP. and Montville.T.J. 1997. **Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers.** USA: ASM Press.

FDA.1992./Bacteriological Analytical Manual.7th.ed. Food and Drug Administration/Association of Official Analytical Chemists. Wash, D.C.

Guthric.R.K. 1992. **Salmonella.** USA:CRC Press, Inc.

J-Yves D’Aoust. **Foodborne Pathogenic Bacteria**. USA:CRC Press, Inc.

Koneman.E.W. and others. 1994. **Introduction to Diagnostic Microbiology.** USA:J.B. LIPPINCOTT.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(อ้างอิงจาก Ronald , 1995)

1. อาหารเหลว Trypticase Soy (Trypticase Soy Broth)

ประกอบด้วย

Trypticase peptone	17.0 ก.
เปปโตน	3.0 ก.
โซเดียมคลอไรด์	5.0 ก.
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.5 ก.
น้ำตาลกลูโคส	2.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

วิธีการเตรียม

1.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2

1.2 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว Selenite Cystine (Selenite Cystine Broth)

ประกอบด้วย

ทริปโตน	5.0 ก.
โซเดียมซีลีไนท์ (sodium selenite)	4.0 ก.
น้ำตาลแลคโตส	4.0 ก.
ซิสตีน (cystine)	0.01 ก.
ไดโซเดียมฟอสเฟต	10.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

วิธีการเตรียม

2.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2

2.2 นำไปกวนและให้ความร้อน ประมาณ 10 นาที อาหารนี้ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

หมายเหตุ

และควรเตรียมอาหารนี้เฉพาะในวันที่ใช้งานเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเหลว Tetrathionate (Tetrathionate Broth)

ประกอบด้วย

โซเดียมไธโอซัลเฟต	40.7 ก.
แคลเซียมคาร์บอเนต	25.0 ก.
โซเดียมคลอไรด์	4.5 ก.
เปปโตน	4.5 ก.
ยีสต์สกัด (yeast extract)	1.8 ก.
เนื้อสกัด (beef extract)	0.9 ก.
สารละลายไอโอดีน	20.0 มล.
น้ำกลั่น	980 มล.

วิธีการเตรียม

3.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นสารละลายไอโอดีนลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 980 มล. จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 7.0 ± 0.2

3.2 นำไปให้ความร้อนโดยการต้มในอ่างน้ำร้อน หรือ ไอน้ำ ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

3.3 นำมาทำให้เย็น จนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3.4 เติมสารละลายไอโอดีน 20 มล. ลงไป ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ

ควรเตรียมอาหารนี้เฉพาะในวันที่ใช้งานเท่านั้น

สารละลายไอโอดีน

ส่วนประกอบต่อ 20 มล.ประกอบด้วย

ไอโอดีน	6.0 ก.
โปแตสเซียมไอโอไดด์	5.0 ก.

การเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งสองชนิดลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มล. ผสมให้เข้ากัน

4. อาหารแข็ง Bismuth sulfite (Bismuth sulfite Agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย

วุ้น	20.0 ก.
$Bi_2(SO_3)$	8.0 ก.
Pancreatic digest of casein	5.0 ก.
Peptic digest of animal tissue	5.0 ก.
เนื้อสกัด	5.0 ก.
น้ำตาลกลูโคส	5.0 ก.
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	4.0 ก.
เฟอริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.3 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

วิธีการเตรียม

4.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.6 $\pm$ 0.2

4.2 นำไปให้ความร้อนโดยการต้มในอ่างน้ำร้อน หรือ ไอน้ำ ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

หมายเหตุ

ควรเตรียมอาหารนี้เฉพาะในวันที่ใช้งานเท่านั้น

5. **อาหารแข็ง Xylose – Lysine Desoxycholate (XLD Agar)**

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	3.0 ก.
L – Lysine	5.0 ก.
ไซโลส	3.75 ก.
เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท	0.8 ก.
โซเดียมไธโอซัลเฟต	6.8 ก.
โซเดียมคลอไรด์	5.0 ก.
โซเดียมดีซอกซีโคเลท	2.5 ก.
น้ำตาลแลคโตส	7.5 ก.
น้ำตาลซูโครส	7.5 ก.
ฟีนอลเรด	0.08 ก.
วุ้น	15.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม

5.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.4 ± 0.2

5.2 นำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำจนสารละลายเดือด ไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

หมายเหตุ

ควรเตรียมอาหารนี้เฉพาะในวันที่ใช้งานเท่านั้น

6. <u>อาหารแข็ง Lysine Indole Motility (LIM Medium)</u>

ประกอบด้วย

โพลีเปปโตน	10.0 ก.
ยีสต์สกัด	3.0 ก.
น้ำตาลเดกซ์โตรส	1.0 ก.
โซเดียมคลอไรด์	30.0 ก.
L – Lysine Dihydrochloride	10.0 ก.
L – Tryptophan	0.5 ก.
บรอมครีซอลเพอเพิล	0.02 ก.
วุ้น	3.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

วิธีการเตรียม

6.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 6.6 ± 0.2

6.2 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. <u>อาหารแข็ง Triple Sugar Iron (TSI Agar)</u>

ประกอบด้วย

โพลีเปปโตน	20.0 ก.
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3.0 ก.
เนื้อสกัด (beef extract)	3.0 ก.
น้ำตาลแลคโตส	10.0 ก.
น้ำตาลซูโครส	10.0 ก.
น้ำตาลเดกซ์โตรส	1.0 ก.
โซเดียมคลอไรด์	30.0 ก.
โซเดียมไธโอซัลเฟต	0.3 ก.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ เฟอรัสซัลเฟต	0.2 ก.
ฟีนอลเรด	0.4 ก.
วุ้น	13.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

วิธีการเตรียม

7.1 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ± 0.2

7.2 ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การลำดับรหัสตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลำดับรหัสตัวอย่าง

เพื่อความสะดวกในการทดลอง จึงได้จัดทำระบบเกี่ยวกับการลำดับรหัสขึ้น ดังนี้

การลำดับรหัส

1. การลำดับรหัสครั้งที่ทดสอบ

1.1 ครั้งที่ทดสอบครั้งที่ 1	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	1
1.2 ครั้งที่ทดสอบครั้งที่ 2	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	2
1.3 ครั้งที่ทดสอบครั้งที่ 3	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	3
1.4 ครั้งที่ทดสอบครั้งที่ 4	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	4

2. การลำดับรหัสตัวอย่างอาหาร

2.1 เนื้อไก่	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	A
2.2 เครื่องในไก่	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	B
2.3 เนื้อหมู	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	C
2.4 เนื้อวัว	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	D
2.5 ไข่ไก่	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	E
2.6 แหนม	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	F
2.7 ไส้กรอกไก่	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	G
2.8 เบคอน	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	H
2.9 หมูยอ	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	I
2.10 ลูกชิ้นเนื้อวัว	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	J

3. การลำดับรหัสอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเหลว TT	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	A
1.2 อาหารเหลว SC	ให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษชนิดตัวพิมพ์ใหญ่	B
1.3 อาหารแข็ง BS	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	1
1.4 อาหารแข็ง XLD	ให้ใช้ตัวเลขอารบิค	2

ตัวอย่าง

1A หมายความว่า เป็นการทดสอบครั้งที่ 1 ของตัวอย่างเนื้อไก่

1AA หมายความว่า เป็นการทดสอบครั้งที่1ของตัวอย่างเนื้อไก่ โดยมี TT เป็น Enrichment

1AA1 หมายความว่า เป็นการทดสอบครั้งที่ 1 ของตัวอย่างเนื้อไก่ โดยมี TT เป็น Enrichment และใช้ BS เป็นอาหารPlating

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

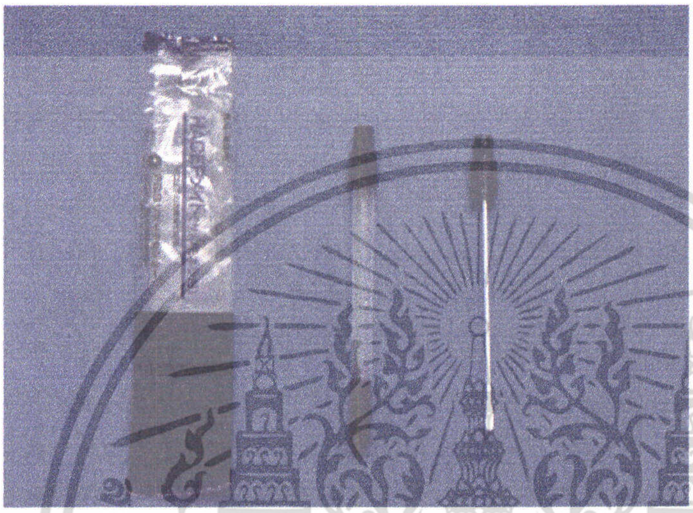
รายละเอียดข้อมูลชุดทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายละเอียดเกี่ยวกับชุดทดสอบ

1. ลักษณะชุดทดสอบ

ใน 1 ซองของชุดทดสอบ จะประกอบด้วย ก้านพลาสติกพันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และ หลอดอาหารทดสอบ ดังรูป



ภาพที่ 16 แสดงชุดทดสอบ *Salmonella* ของ Medvet

2. วิธีการใช้ชุดทดสอบ

2.1 ฉีกภาชนะบรรจุ (ซอง) ที่ใส่ชุดทดสอบออก

2.2 นำส่วนที่เป็นก้านสำลีไปจุ่มในตัวอย่างอาหารที่ผ่านการบ่มแล้ว 24 ชั่วโมง

2.3 นำก้านสำลีมาใส่ลงไปในหลอดอาหารทดสอบ ปิดฝาให้แน่น

2.4 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5 อ่านและบันทึกผลการทดลอง

2.6 ภายหลังจากที่ทำการทดลองแล้ว ต้องนำหลอดทดสอบไปทำให้ไร้เชื้อก่อนจะทิ้งทุกครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การอ่านและแปรผลการทดลอง

Salmonella
Negative : Purple
Positive *Salmonella* : Black

หมายเหตุ

ในกรณีที่ตัวอย่างที่ทดสอบมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Proteus* อยู่ด้วย ก็จะสามารถให้ผลบวกกับชุดทดสอบเช่นกัน ข้อแตกต่างระหว่างกลุ่ม *Proteus* และ *Salmonella* คือ โคโลนีของ *Proteus* จะมีสีดำอ่อนๆหรือไม่ดำเข้มอย่างโคโลนีของ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณทางสถิติ

(โปรแกรม OBS [SAS] ชนิด Non – parameter แบบ Chi – square)

1. <u>การประมวลผลการทดลองวิธีมาตรฐาน Conventional</u>

TABLE OF TRT BY OBS

TRT OBS

Frequency |
Percent |
Row Pct |
Col Pct |

	1	2	Total
b	38	2	40
	65.52	3.45	68.97
	95.00	5.00	
	69.09	66.67	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.. การประมวลผลการทดลองวิธีรวดเร็ว

TABLE OF TRT BY OBS

```
TRT      OBS

Frequency|
Percent   |
Row Pct   |
Col Pct   |      1|        2|  Total
---------+---------+---------+
a        |     8  |   32    |    40
         | 10.00  | 40.00   |  50.00
         | 20.00  | 80.00   |
         | 17.39  | 94.12   |
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>3. ประมวลผลผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อสกุล *Salmonella* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีรวดเร็วเทียบกับวิธีมาตรฐาน</u>

TABLE OF TRT BY OBS

TRT OBS

TRT	Frequency / Percent / Row Pct / Col Pct	1	2	Total
a	Frequency	8	32	40
	Percent	10.00	40.00	50.00
	Row Pct	20.00	80.00	
	Col Pct	17.39	94.12	
b	Frequency	38	2	40
	Percent	47.50	2.50	50.00
	Row Pct	95.00	5.00	
	Col Pct	82.61	5.88	
Total		46	34	80
		57.50	42.50	100.00

STATISTICS FOR TABLE OF TRT BY OBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	1	46.036	0.000
Likelihood Ratio Chi-Square	1	53.183	0.000
Continuity Adj. Chi-Square	1	43.018	0.000
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	45.460	0.000
Fisher's Exact Test (Left)			1.38E-12
(Right)			1.000
(2-Tail)			2.76E-12
Phi Coefficient		-0.759	
Contingency Coefficient		0.604	
Cramer's V		-0.759	

Sample Size = 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้