บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Media)

- Alkaline Peptone Water (APW)
- Brilliant Green Lactose Broth (2% BGLB)
- Brain Heart Infusion Broth (BHI) + plasma
- EC Broth
- Lauryl Sulfate Broth (LSB)
- Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV)
- Mannitol Salt Agar (MSA)
- Motility, Indole and Lysine decarboxylation, Lysine deamination Agar (MIL)
- Mueller-Hinton Agar (MHA)
- Nutrient Broth (NB)
- Nutrient Broth + 0% , 1% , 3% , 8% , 10% NaCl
- Nutrient Agar (NA)
- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Simmon Citrate Agar
- Selenite F Broth (SF broth)
- Stuart transport medium
- Trypticase Soy Agar (TSA)
- Triple Sugar Iron Agar (TSI)
- Trypticase Soy Broth (TSB) + 10% NaCl
- Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

2. น้ำยา (Reagent)

- Butterfield's Phosphate Buffer Dilution Water pH 7.2
- 3% H_2O_2
- Kovacs' reagent
- Oxidase reagent
- *Salmonella* polyvalent A-I และ Vi antiserum หรือ A-65
- *Salmonella* antiserum group A, B, C, D, E
- ชุดสีย้อมแกรม

3. เครื่องมือ (Equipment)

- Autoclave
- Hot air oven
- Incubator
- Microwave
- pH meter
- Balance
- Water bath
- Vortex mixer
- Microscope
- Hot plate
- Magnetic stirrer

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ระเบียบวิธีวิจัย

แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร
2. การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำดื่มและเครื่องดื่ม
3. การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากอุจจาระของผู้ประกอบการขายอาหาร

การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร จากร้านในอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติกระทำในระหว่างเดือนเมษายน ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 ดังนี้

1. อาหาร เก็บโดยวิธีสุ่มจากตัวอย่างอาหารจากร้านจำนวน 11 ร้าน (ร้านเบอร์ 1-10 และ 14) ร้านละ 2-5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 34 ตัวอย่าง ชนิดและจำนวนตัวอย่างอาหารแสดงในตารางที่ 3ก.

2. ภาชนะสัมผัสอาหาร เช่น จาน ชาม ถ้วย ช้อน แก้วน้ำ และหลอดดูดสุ่มเก็บจากร้านอาหารและร้านเครื่องดื่มจำนวน 13 ร้านๆละ 2-3 ตัวอย่าง (ร้านเบอร์ 1-13) รวมทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ตามรายละเอียดในตารางที่ 3ข.

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนตัวอย่างอาหารและภาชนะเก็บเพื่อตรวจทางจุลชีววิทยา

ลำดับที่	ชนิดของอาหารหรือภาชนะ	จำนวนตัวอย่าง	ร้าน
	ก. อาหาร		
1.	ข้าวเปล่า	5	3, 4, 5, 7, 8
2.	ข้าวราดหน้าต่าง ๆ	4	6, 9
3.	กับข้าว	13	3, 4, 5, 7, 8, 10
4.	ก๋วยเตี๋ยวและข้าวต้ม	7	2, 6, 8, 9
5.	ส้มตำ	1	10
6.	ขนมหวาน	2	1
7.	ชาลาเปาและกุ้ยช่าย	2	14
	รวม	34	
	ข. ภาชนะ		
8.	จาน	7	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
9.	ชาม	3	2, 6, 8
10.	ถ้วย	1	4
11.	ช้อน	13	1-13
12.	แก้วน้ำ	3	11, 12, 13
13.	หลอดดูด	3	11, 12, 13
	รวม	30	

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

การตรวจตัวอย่างอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารทางจุลชีววิทยา

การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารตรวจ ตามวิธีมาตรฐานของ Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA)[14] ดังต่อไปนี้

การเตรียมตัวอย่างอาหาร (Preparation of food suspension) ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม นำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาละลายใน Butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (dilution 1:10) ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ รา จำนวน coliform bacteria และแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ ต่อไป

การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count) โดยวิธี Aerobic plate count

1. ดูดตัวอย่างอาหาร มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Flask ที่มี Butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำ serial dilution จนได้ dilution 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}

2. ดูดสารละลายตัวอย่างอาหาร dilution 10^{-2} ,10^{-3}, 10^{-4} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน sterile petri dish โดยทำ dilution ละ 2 จาน

3. เท melted NA ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งคว่ำ plate อบที่ 35° ซ. นาน 48 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวนเป็น CFU/g ของอาหารตัวอย่าง

การตรวจหาปริมาณยีสต์และรา โดยวิธี Standard pour plate

1. ดูดตัวอย่างอาหาร มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Flask ที่มี Butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นทำ serial dilution จนได้ dilution 10^{-2}, 10^{-3} , 10^{-4}

2. ดูดตัวอย่างอาหารที่เตรียมได้จาก dilution 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน sterile petri dish โดยทำ dilution ละ 2 จาน

3. เท melted PDA ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน

4. นับจำนวนโคโลนีของยีสต์ และราคำนวณเป็น CFU/g ของตัวอย่างอาหารและนำโคโลนีมาย้อมแกรม

การตรวจหา Total coliform bacteria โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

มี 3 ขั้นตอน คือ 1. Presumptive test

2. Confirmed test

3. Completed test

Presumptive test

1. ดูดตัวอย่างอาหารลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้ คือ

ชุดที่ 1 LST broth หลอดละ 10 ml 3 หลอด

ชุดที่ 2 LST broth หลอดละ 10 ml 3 หลอด

ชุดที่ 3 LST broth หลอดละ 10 ml 3 หลอด

โดยใส่ตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 , 0.1 และ 0.01 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

2. เขย่าหลอดเบา ๆ นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 24 ชั่วโมง

3. ถ้ามีแก๊สใน Durham's tube เกิน 10% ถือว่าให้ผลบวก ถ้าเกิดแก๊สน้อยกว่าหรือไม่มีให้อบต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วอ่านผลอีกครั้งหนึ่ง

Confirmed test

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นตอน Presumptive test ทุกหลอดๆละ 2-3 loop ลงใน 2% BGLB

2. เขย่าหลอดเบา ๆ นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 24 ชั่วโมง ถ้ามีแก๊สใน Durham's tube เกิน 10% ถือว่าให้ผลบวก ถ้าเกิดแก๊สน้อยกว่าหรือไม่มีให้อบต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในหลอดทดลองชุดที่1 , 2 และ 3 ในขั้นตอน Confirmed test นำตัวเลขที่ได้ไปเปิดหาค่า ในตาราง MPN ภาคผนวก

Completed test

1. นำหลอดที่ให้ผลบวกจากขั้นตอน Confirmed test ลง EC broth

2. นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 24 ชั่วโมง

3. ถ้ามีแก๊สใน Durham's tube เกิน 10% ถือว่าให้ผลบวก ถ้าเกิดแก๊สน้อยกว่าหรือไม่มีให้อบต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การตรวจหา Fecal coliform โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นตอน Presumptive test ของการตรวจหา Total coliform bacteria ทุกหลอดๆ ละ 2-3 loop ลงใน EC broth เขย่าหลอดเบา ๆ

2. นำไปอบที่ 44.5°ซ. นาน 24 ชั่วโมง

3. ถ้ามีแก๊สใน Durham's tube เกิน 10% ถือว่าให้ผลบวก ถ้าเกิดน้อยกว่าหรือไม่มีให้อบต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง

นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกที่ในหลอดทดลองชุดที่ 1 , 2 และ 3 นำตัวเลขที่ได้ไปเปิดหาค่าในตาราง MPN ภาคผนวก

การตรวจหาเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus*

1. ดูดตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB +10% NaCl 10 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วอบที่ 37° ซ. นาน 48 ชั่วโมง

2. ดูดตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตร แล้วนำมา spread บน MSA 3 จาน (จาน ละ 0.4 ,0.3 และ 0.3 มิลลิลิตร) อบที่ 37°ซ. นาน 24-48 ชั่วโมง นับรวมจำนวนโคโลนีสีเหลืองที่ขึ้นทั้ง 3 จาน และเลือกโคโลนีสีเหลืองบน MSA มาย้อมแกรม ทดสอบ catalase , coagulase

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. [6,15]

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาละลายใน NB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 24 ชั่วโมง

2. ดูดตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงใน SF broth 10มิลลิลิตร ไปอบที่ 37°ซ. 24-48 ชั่วโมง

3. ถ่ายเชื้อจาก SF broth ลงบน MSRV 5 จุด นำไปอบที่ 42° ซ. นาน 24 ชั่วโมง เชื้อที่ให้ผลบวกจะมีโคโลนีแผ่สีขาวขุ่น นำเชื้อมาทดสอบชีวเคมีได้แก่ TSI , MIL , citrat , urease , SIM

4. จากผลการทดสอบชีวเคมี ถ้าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. ให้นำมาทดสอบกับ *Salmonella* polyvalent A-I และ Vi antiserum และ *Salmonella* antiserum group A, B, C, D, E เพื่อจำแนก serotype ต่อไป

การตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus*

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม บดให้ละเอียด แล้วนำมาละลายใน 2% NaCl solution 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง

2. นำตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน APW 10 มิลลิลิตร อบที่ 37° ซ. นาน 24 ชั่วโมง

3. streak ลงบน TCBS นำไปอบที่ 37° ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง ผลบวกจะให้โคโลนีสีเขียว นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบ oxidase, motility, TSI , 0% , 1% , 3% , 8% , 10% NaCl

การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อชิ้นภาชนะสัมผัสอาหาร

1. ใช้ sterile swab จุ่มน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเช็ดภาชนะสัมผัสอาหารดังต่อไปนี้
   - แก้วน้ำ เช็ดจากขอบบนลงมาครึ่งนิ้ว ทั้งภายในและภายนอก
   - จาน ชาม ถ้วย เช็ดตรงกลางให้ได้พื้นที่ประมาณ 2x2 ตารางนิ้ว
   - ช้อน เช็ดโดยรอบจากปลายขึ้นมา 1 ½ นิ้ว
   - หลอดดูด เช็ดโดยรอบจากขอบบนลงมา 1 นิ้ว ทั้งภายในและภายนอก

2. ใส่ swab ที่เช็ดภาชนะแล้วลงในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ จะได้ dilution 10^{-2}

3. ดูด dilution จากข้อ 2 มา 1 และ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน sterile petri dish อย่างละ 2จาน จะได้ dilution 10^{-2}, 10^{-3} ตามลำดับ

4. เท melted NA ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ลงใน จานอาหาร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งให้อาหารแข็ง นำไปอบที่ 35° ซ. นาน 24 ชั่วโมง

5. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น คำนวณเป็น CFU/ ชิ้นภาชนะ

เกณฑ์มาตรฐาน

คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กำหนดมาตรฐานทางจุลินทรีย์[16] ดังนี้

1. อาหารที่ผ่านกรรมวิธีหรือปรุงสุกแล้ว เช่น ข้าวแกง ก๋วยเตี๋ยว ขนมจีน ยำ ของหวาน ใช้เกณฑ์มาตรฐานดังนี้

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด / กรัม	$< 1x10^6$
จำนวนยีสต์ / กรัม	$< 1x10^4$
จำนวนเชื้อรา / กรัม	< 500
MPN coliform / กรัม	< 500
MPN *E. coli* / กรัม	< 3
เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ	
S. aureus / กรัม	< 100
B. cereus / กรัม	< 100
C. perfringens / 0.01 กรัม	ไม่พบ
Salmonellae / 25 กรัม	ไม่พบ

2. อาหารดิบที่เตรียมหรือปรุงในสภาพบริโภคได้ทันที เช่น ผัก ผลไม้ที่ล้างแล้ว สลัด ส้มตำ

จำนวนยีสต์ / กรัม	$< 1x\ 10^4$
จำนวนรา / กรัม	< 500
MPN *E.coli* / กรัม	< 10
Salmonellae / 25 กรัม	ไม่พบ

3. ภาชนะสัมผัสอาหาร

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด / ชิ้นภาชนะ	$< 10^3$

การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มและน้ำดื่ม

การเก็บและชนิดของตัวอย่าง : ชนิดของเครื่องดื่มที่นำมาตรวจประกอบด้วย

1. น้ำดื่ม
2. น้ำแข็ง
3. เครื่องดื่มที่มีนมเป็นองค์ประกอบ เช่น กาแฟ นมเย็น โกโก้ เป็นต้น
4. เครื่องดื่มประเภทน้ำหวานที่ไม่มีนมเป็นองค์ประกอบ เช่น ชาดำเย็น โอเลี้ยง เป็นต้น
5. น้ำผลไม้ เช่น น้ำส้ม น้ำสับปะรด น้ำลำไย เป็นต้น
6. น้ำปั่นประเภทต่างๆ เช่น น้ำมะพร้าวปั่น น้ำแตงโมปั่น น้ำส้มปั่น เป็นต้น
7. น้ำอัดลม

1. เก็บตัวอย่างเครื่องดื่ม น้ำดื่ม และน้ำแข็ง จากร้านขายเครื่องดื่มทั้ง 4 ร้านภายในบริเวณอาคารโภชนาการ ร้านละ 4-7 ตัวอย่าง รวม 25 ตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างตามประเภทของเครื่องดื่มที่มีจำหน่าย เครื่องดื่มทุกชนิด (ยกเว้นน้ำปั่นประเภทต่าง ๆ) เก็บแยกโดยไม่ใส่น้ำแข็ง

2. สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำดื่มเพิ่มเติมที่จุดบริการน้ำดื่มภายในมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 6 จุด รวม 6 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากเครื่องทำน้ำเย็นชนิดมีถังน้ำคว่ำอยู่บนเครื่อง จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากเครื่องทำน้ำเย็นที่มีระบบกรองน้ำโดยตรงจำนวน 3 ตัวอย่าง

การตรวจตัวอย่างน้ำ และเครื่องดื่ม

ทำการตรวจหาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มและน้ำดื่มตามวิธีมาตรฐานของ American Public Health Association (APHA) [17] และ Official Method of Analysis of the Association of Official Chemists (AOAC)[18]

การตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และ *E. coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN)[17]

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน :

1. Presumptive test
2. Confirmed test
3. Completed test

Presumptive test

1. ดูดน้ำตัวอย่างใส่หลอดทดลองชุดที่ 1 หลอดละ 10 มิลลิลิตร, หลอดชุดที่ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร และหลอดชุดที่ 3 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

ชุดที่ 1 : lactose broth double strength 10 มิลลิลิตร 5 หลอด

ชุดที่ 2 : lactose broth single strength 10 มิลลิลิตร 5 หลอด

ชุดที่ 3 : lactose broth single strength 10 มิลลิลิตร 5 หลอด

2. เขย่าหลอดเบา ๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับน้ำตัวอย่าง

3. นำหลอดทั้งหมดไปบ่มในตู้เพาะเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง

4. อ่านผลโดยหลอดที่มีแก๊สในหลอดเก็บแก๊สเกิน 10 % เป็นผลบวก ถ้าน้อยกว่าหรือไม่มีอ่านผลเป็นลบ

Confirmed test

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นตอน Presumptive test หลอดละ 4-5 หยดลงใน 2% BGLB

2. เขย่าหลอดเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันดีและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. อ่านผลถ้ามีแก๊สในหลอดเกิดขึ้นมากกว่า 10 % ถือเป็นผลบวก

นำจำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในหลอด Confirmed test ไปเปิดค่า MPN จากตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก) จะได้ค่า MPN Total coliform ต่อน้ำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

Completed test

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในขั้นตอน Confirmed test ลงใน EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เลือกลักษณะโคโลนีที่เป็น metallic sheen และลักษณะอื่น ๆ ถ่ายเชื้อลงใน TSI และ MIL บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. อ่านผล TSI และ MIL

การตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus*

1. ดูดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงใน TSB + 10% NaCl 10 มิลลิลิตร
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. ถ่ายเชื้อจาก TSB + 10% NaCl ไปเพาะเลี้ยงบน MSA โดย streak ในลักษณะที่จะให้โคโลนีแยกจากกันหลังการบ่ม บ่มไว้ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองไปย้อมสีแกรมและ ทดสอบ coagulase test

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* [19]

1. ดูด lactose broth (double-strength) จากขั้นตอน presumptive test 1 มิลลิลิตร ลงใน Selenite F broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 0.5 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. หยด Selenite F broth ลงบนผิวหน้า MSRV 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3. ถ้าพบการเจริญของโคโลนีสีขาวอมเทา แผ่กระจายไปทั่ว plate ให้ถือว่าเป็นผลบวกเบื้องต้น นำเชื้อมา subculture บน SS agar และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (TSI, MIL)
4. นำเชื้อที่ได้ผลทดสอบทางชีวเคมีเป็น *Salmonella* มาทำปฏิกิริยา agglutination กับ antiserum ของ *Salmonella* polyvalent A-I and Vi

การตรวจหาปริมาณยีสต์และราโดยวิธี Standard pour plate

1. ดูดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงใน sterile petri dish
2. เติม melted PDA 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน
3. นับโคโลนีของยีสต์และรา และรายงานผลเป็น CFU/ มิลลิลิตร

เกณฑ์มาตรฐาน

ผลการตรวจวิเคราะห์หาโคลิฟอร์มแบคทีเรีย . ชนิด *E. coli* และเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. และปริมาณยีสต์ และรา ของตัวอย่างเครื่องดื่ม น้ำดื่ม และน้ำแข็ง ทั้งหมดนำไปเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลชีววิทยา กับมาตรฐานประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมาตรฐานประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (พ.ศ. 2536)

เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร

เรื่อง

เครื่องดื่มหาบแร่แผงลอย [20]

<u>คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์</u>

1. ตรวจพบปริมาณยีสต์ต่อเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 1×10^3
2. ตรวจพบปริมาณราต่อเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 100
3. ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มต่อเครื่องดื่ม 100 มิลลิลิตร โดยวิธี MPN (Most Probable Number)	น้อยกว่า 20
4. ตรวจพบค่า MPN *E. coli* ต่อเครื่องดื่ม 100 มิลลิลิตร	น้อยกว่า 2
5. *S. aureus* ต่อเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร	ไม่พบ
6. *C. perfringens* ต่อเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร	ไม่พบ
7. *Salmonellae* ต่อเครื่องดื่ม 50 มิลลิลิตร	ไม่พบ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ฉบับที่ 61 (พ.ศ. 2524)

เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท [21]

<u>คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์</u>

1. ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มน้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำบริโภค 100 มิลลิลิตร โดยวิธี MPN (Most Probable Number)
2. ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli (Escherichia coli)*
3. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ฉบับที่ 137 (พ.ศ. 2534)

เรื่อง น้ำแข็ง [22]

<u>คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์</u>

1. ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มน้อยกว่า 2.2 ต่อ 100 มิลลิลิตร โดยวิธี MPN (Most Probable Number)
2. ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli (Escherichia coli)*
3. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในผู้ประกอบการขายอาหาร

การเก็บตัวอย่าง

เก็บอุจจาระจากผู้ประกอบการขายอาหารจำนวน 16 ร้าน ร้านละ 1-5 ราย รวม 51 ราย ในระหว่างเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม 2541 โดยใช้ไม้พันสำลีป้ายอุจจาระ และใส่ใน transport medium รายละ 2 หลอด

วิธีการตรวจ

1. นำไม้พันสำลีที่ป้ายอุจจาระของผู้ประกอบการ ใส่ลงใน SF broth และ Buffer Peptone Water (BPW) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 16-20 ชั่วโมง

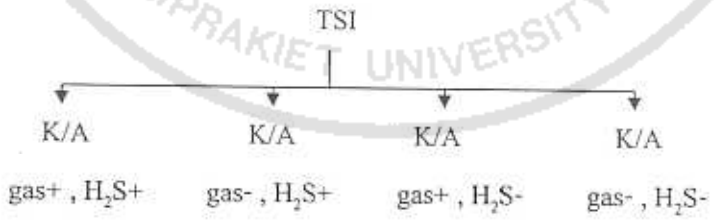
2. ผสมเชื้อในหลอด โดยใช้ vortex mixer จากนั้นถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงบนหน้า MSRV medium จำนวน 3 หยด ประมาณหยดละ 0.1 มิลลิลิตร ให้ห่างกันพอสมควร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง โดยไม่คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

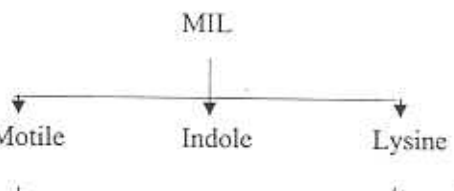
3. ถ่ายเชื้อจาก SF broth บน SS agar โดย streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง

4. อ่านผลบน MSRV medium โดยผลบวกจะมีการเคลื่อนที่ของ *Salmonella* จากจุดที่หยดอาหารและแผ่เป็นวงกลมทึบแสงสีขาวขุ่น ใช้เข็มเขี่ยแตะบริเวณขอบวงแผ่และนำไปทดสอบ TSI และ MIL บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 18-24 ชั่วโมง

5. อ่านผลบน SS agar โดยเลือกลักษณะโคโลนีที่เป็น Non lactose fermenter (NL) และ Non lactose fermenter ซึ่ง H_2S (NL ซึ่ง H_2S) ไปทดสอบ TSI และ MIL

6. อ่านผลปฏิกิริยาของ TSI และ MIL โดยเลือกลักษณะของ *Salmonella* ดังต่อไปนี้





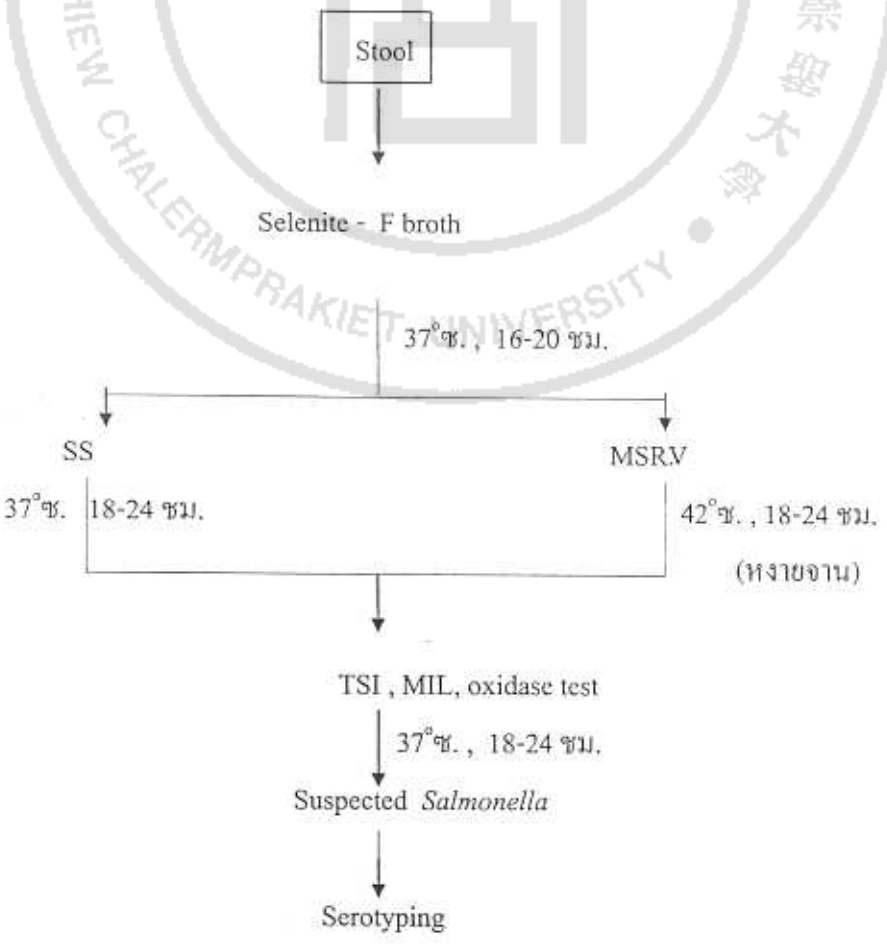
ยกเว้น *S. paratyphi* A -/-

7. ตรวจยืนยันและหา Serotype ของ *Salmonella* โดยใช้หลักการเกิด agglutination ระหว่างเชื้อและ *Salmonella* antiserum poly A-65 หรือ poly A-I and Vi ดังนี้

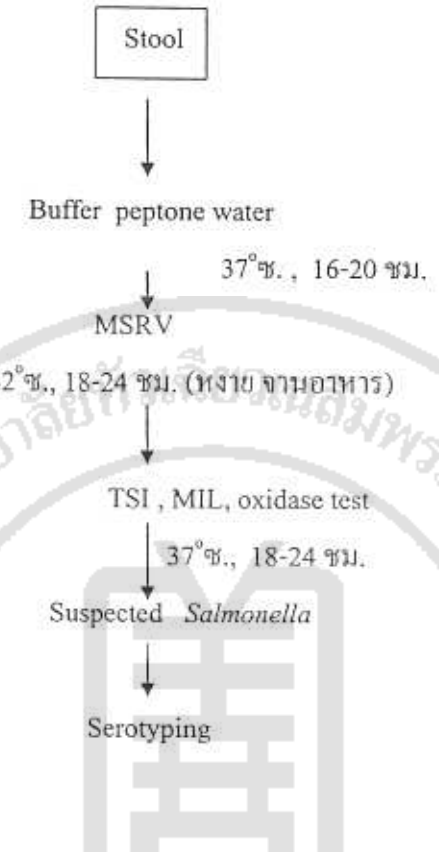
1. หยด O polyvalent A-65 antiserum และน้ำเกลือ (เป็น control) อย่างละ 1 หยดลงบนสไลด์ที่ใสสะอาด
2. ใช้ wire loop เขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSI agar บริเวณส่วน slant) จำนวนเล็กน้อย นำมาผสมกับ antiserum และน้ำเกลือ เอียงสไลด์กลับไปมาประมาณ 1 นาที
3. อ่านผลการเกิด agglutination ด้วยตาเปล่าบนพื้นสีดำเทียบ control ที่มีน้ำเกลืออย่างเดียว เพื่อป้องกันเกิด autoagglutination
4. กรณีที่ให้ผลบวก (positive) แสดงว่าเชื้อมี somatic antigen ระหว่าง group A-65 ให้ทดสอบแยก group โดยปฏิบัติตามข้อ 1-3 แต่ใช้ antiserum monovalent group ครั้งละ 1 หยด แทน antiserum poly A-65 จนพบผลบวก group ใด เช่น group A,B, C, D, E

รูปที่ 1 แสดงการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากอุจจาระของผู้ประกอบการขายอาหาร

(1) การใช้อาหาร Selenite F broth (SF) เป็น enrichment medium



(2) การใช้ Buffer peptone water (BPW) เป็น pre-enrichment medium



HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY