การตรวจหาความแม่นยำในการวัดจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าด้วยวิธี Most Probable Number Technique

Accuracy of Most Probable Number Technique for *Salmonella* spp.

วรานนท์ พรหมกิ่งแก้ว[1] ดวงพร พิชผล[2] ภาวิน ผดุงทศ[2]
Varanonth Promkingkaew[1] Duangporn Pichpol[2] Pawin Padungtod[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำในการตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าด้วยวิธี most probable number (MPN) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณทางอ้อม กับการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งเป็นการวัดปริมาณทางตรง และเปรียบเทียบความสามารถของ Selective-enrichment broth 2 ชนิดคือ Rappaport-Vassiliadis broth และ Tetrathionate broth จำนวนทั้งหมด 62 ครั้ง โดยใช้ *Salmonella* Rissen พบบ่อยในฟาร์มสุกรจังหวัดเชียงใหม่ จากผลการทดลองพบว่าจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่นับได้จากวิธี MPN และการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไม่แตกต่างกัน (p = 0.075) และการใช้ Selective enrichment broth ระหว่าง Rappaport-Vassiliadis broth และ Tetrathionate broth พบว่ามีความสามารถในการตรวจเชื้อซัลโมเนลล่าไม่แตกต่างกัน (p = 0.773) วิธี MPN เหมาะสมในการตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าได้ และการใช้ Rappaport-Vassiliadis broth ให้ผลในการตรวจเชื้อซัลโมเนลล่าได้เหมือนกับ Tetrathionate broth

คำสำคัญ: most probable number ความแม่นยำ เชื้อซัลโมเนลล่า
Keywords: most probable number, accuracy, Salmonella

[1] บริษัท แหลมทองสหการ จำกัด
Lamtongsahakan Co.,Ltd.
[2] สาขาวิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100
Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50100

Abstract

The objective of the study is to compare the accuracy of bacterial count method between the Most Probable Number which is an indirect count method and Total Bacteria Count which is the direct count method, and to compare the efficiency of 2 selective-enrichment broth (Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate broth) for the detection of salmonella. All 62 times were *Salmonella* Rissen frequently found in Chiang Mai pig farms. From this study, the salmonella count from MPN and total bacteria count were not significantly difference (p = 0.075). Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate broth yielded similar result for salmonella isolation (p = 0.773). The MPN method is suitable for counting the number of salmonella. Rappaport-Vassiliadis broth yield similar result of Tetrathionate broth for salmonella isolation.

บทนำ

การติดเชื้อซัลโมเนลล่า เกิดขึ้นได้ทั้งในคนและสัตว์ และเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศ โดยเฉพาะในประเทศด้อยพัฒนาและประเทศกำลังพัฒนา ทั้งในด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ การที่มีเชื้อปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ซึ่งจะส่งไปยังต่างประเทศ มีผลให้อาหารดังกล่าวไม่ได้มาตรฐานอาหารและวัตถุดิบตามกฎระเบียบที่กำหนด (Bell and Kyriakides, 2002)

เชื้อซัลโมเนลล่านอกจากจะพบในคนแล้ว ยังพบในสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์หลายชนิด เช่น ไก่ ไข่ไก่ สุกร รวมทั้งสัตว์เลื้อยคลานต่างๆ เช่น จิ้งจก งู และแมลงสาบ (นลินี และคณะ, 2544) จากผลการสำรวจซัลโมเนลล่าในอีกัวน่าของสวนสัตว์เชียงใหม่จำนวน 16 ตัว พบเชื้อซัลโมเนลล่าร้อยละ 87.5 (กรรณิการ์, 2544) จากการสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารสดที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด พบว่าไข่ไก่ เนื้อไก่ เครื่องใน มีเชื้อกลุ่มนี้ในอัตราสูง จากตัวอย่างเนื้อไก่ 60 ตัวอย่าง จากตลาดสด 5 แห่งในเขตเทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าร้อยละ 83.33 มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลล่า (ศนิกานต์, 2545)

เชื้อซัลโมเนลล่าสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ขั้นตอนแรกของการผลิตอาหาร เช่น ในฟาร์มเลี้ยงสุกร ในตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ จนถึงผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตออกมา *Salmonella* Rissen เป็นซีโรไทป์ที่พบมากที่สุดในฟาร์มสุกรจำนวน 13 ฟาร์มของจังหวัดเชียงใหม่ อยู่ในซัลโมเนลล่า Type C (6,7 : f,g : -) (อาภาพรรณ, 2547) และจากการตรวจอาหารที่วางจำหน่ายในประเทศไทยพบว่าเชื้อซัลโมเนลล่าปนเปื้อนในอาหารเป็นลำดับที่ 3 (อรุณ และคณะ, 2546) และทำให้ผู้ป่วย

ท้องเสีย ลำดับที่ 6 (เกสร และสุภาภรณ์, 2546) จากรายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลล่าในตัวอย่างคน อาหาร และน้ำ ในปี 1993 – 2002 พบ *Salmonella* Rissen มากเป็นอันดับ 6 จาก 25 ซีโรไทป์ ในซีโรไทป์พบบ่อยในประเทศไทย และมีแนวโน้มที่จะตรวจพบจากตัวอย่างส่งตรวจมากขึ้นเรื่อยๆ (อรุณ และคณะ, 2546)

ความสำคัญของโรคที่เกิดจากเชื้อซัลโมเนลล่า ทำให้ต้องมีการคิดวิธีการในการตรวจหาตัวเชื้อ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในอาหาร และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งวิธีที่ใช้ในการตรวจ มีหลายแบบ แต่วิธีที่หลายๆ แห่งยอมรับ คือ การเพาะตัวอย่างเชื้อใน Pre-enrichment จากนั้นทำการย้ายลงในอาหารคัดเลือก และส่งเสริมการเจริญของเชื้อชนิดเหลว (Selective-enrichment broths) 2 ชนิด หลังจากทำการบ่มแล้วให้ทำการ streak ลงบนอาหารคัดเลือกเชื้อชนิดแข็ง (Selective plating media) อีก 2 ชนิด หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะเพื่อมาทำการตรวจทางชีวเคมี และซีรั่มวิทยา (Bell and Kyriakides, 2002)

การตรวจวัดหาจำนวนจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Standard plate count ซึ่งเหมาะกับการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีมากกว่า 100 เซลล์/กรัม หรือ มิลลิลิตร และ Most Probable Number method (MPN method) (McMeekin, 2003) ซึ่งวิธี MPN เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อที่มีจำนวนน้อย (< 100 เซลล์/กรัม) และในกรณีที่ต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมากจนไม่สามารถใช้วิธี Standard plate count ได้ หรือเซลล์แบคทีเรียได้รับความเสียหายมาก่อนในขั้นตอน Pre-enrichment (McMeekin, 2003) โดยวิธีนี้จะช่วยให้เซลล์แบคทีเรียคืนสภาพและเจริญเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการได้ ซึ่งเชื้อซัลโมเนลล่าจำเป็นต้องมีขั้นตอนนี้ การตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าจะมีผลช่วยในการประเมินความเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนล่าในขบวนการผลิตอาหารจากเนื้อสัตว์ รวมทั้งเป็นแนวทางในการป้องกัน และใช้ในการจัดการเพื่อลดโอกาสในการปนเปื้อนได้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความแม่นยำของวิธี MPN โดยเทียบค่าที่วัดได้กับจำนวนเชื้อที่นับจากวิธี Total bacteria count และเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าของ Selective-enrichment broth ระหว่าง Rappaport-Vassiliadis (RV) และ Tetrathionate broth (TT) โดยวิธี MPN

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อที่ใช้

การศึกษานี้ใช้เชื้อ *S.* Rissen ที่แยกได้จากฟาร์มสุกรเพียงชนิดเดียวเพื่อลดความแปรปรวนจากความแตกต่างกันของชนิดเชื้อ ทำให้ได้ผลการศึกษาที่แม่นยำมากขึ้น จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 62 ตัวอย่าง จึงจะสามารถพบความแตกต่างระหว่างจำนวนแบคทีเรีย $\log_{10}$ (0.3) เมื่อส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ $\log_{10}$ (0.8) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% power 80%

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial preparation)

เตรียมเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5 MacFarland (ประมาณ 1 - 2 x 10^8 cfu/ml) ใน Normal saline solution (NSS) แล้วลดความเข้มข้นลงมาจนถึง 10^2 cfu/ml จากนั้น ดูดสารละลายจากความเข้มข้น 10^2 cells/ml มา 5 ml ทำ 2-fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 5 x 10^1 cfu/ml (สาร A) แล้วทำ 10-fold dilution ต่ออีก 3 dilution เพื่อให้ได้อีก 3 ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย (สาร B, C และ D) ซึ่งจะได้ค่าประมาณ 5 cfu/ml, 5 cfu/10 ml และ 5 cfu/100 ml

3. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria Count)

ใช้สารละลายจาก A - D ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นละ 2 จาน (Duplication) จานละ 1 ml (ในการทำแต่ละความเข้มข้น จะทำไปพร้อมกับการทำ MPN) แล้วเท Sterile Nutrient agar ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การตรวจหาจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่า ด้วยวิธี 3-tube MPN (ประยุกต์จาก Cuniff, 1998)

ดูดสารละลายตัวอย่าง ตั้งแต่สารละลาย A - D ความเข้มข้นละ 1 ml ใส่ลงใน Peptone water (Buffer) (BPW) 9 ml โดยจะใช้ BPW 3 หลอด ต่อ 1 ความเข้มข้น (รวมใช้ BPW 12 หลอด) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผลหลอดที่ BPW ขุ่น แล้วทำการบันทึกผล

5. การยืนยันผลของ MPN

5.1 การเลือกเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ดูด BPW ที่บ่มแล้วจากขั้นตอนที่ 4 หลอดละ 0.1 ml ใส่ลงใน Rappaport-Vassiliadis broth (RV) 10 ml บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง และอีก 1 ml ใส่ลงใน Tetrathionate broth (TT) 10 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง และขั้นตอนนี้จะเลือกหลอดที่ BPW ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อซัลโมเนลล่า คืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น เพื่อทดสอบความสามารถของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Selective-enrichment broth) แล้วทำการบันทึกผลที่ได้

5.2 การแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร (loop) จุ่มเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (RV และ TT) เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง คือ XLD agar และ Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose Agar (BPLS agar) แต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จะเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้งสองชนิด แล้วทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง และบันทึกลักษณะโคโลนีที่ได้ โคโลนีของ *S.* Rissen บน XLD agar โคโลนีจะกลม นูน ใส กลางโคโลนีมีการสร้างจุดสีดำ (ไฮโดรเจนซัลไฟต์ : H_2S) และอาหารรอบๆ โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีแดง และ BPLS agar โคโลนีจะกลม นูนเล็กน้อย โคโลนีออกสีชมพู และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ จะเปลี่ยนเป็นสีแดง หรือชมพู

6. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว RV และ TT

จากการทำ MPN จะมีตัวอย่างใน RV และ TT ที่มีเชื้อจำนวน 444 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบผลการตรวจว่ามีอัตราการพบเชื้อซัลโมเนลล่า แตกต่างกันหรือไม่ ทั้งนี้ จำนวนตัวอย่าง 444 คู่ จะเพียงพอสำหรับตรวจพบอัตราการพบเชื้อที่แตกต่างกัน 3 เท่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% power 80%

7. การอ่านผล และวิเคราะห์ผล

อ่านผล MPN ตามตารางมาตรฐานของ AOAC international (Cuniff, 1998) โดยใช้จำนวนหลอด BPW ที่ขุ่นจากข้อ 4 ซึ่งทดลองถึงข้อ 5.2 ได้ผลยืนยันเป็นเชื้อ *S.* Rissen จริง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจากวิธี Standard plate count (เชื้อที่นับได้จากจานที่ความเข้มข้น 0.5 x 10^2 cells/ml)

การวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้สถิติ Wilcoxon signed ranks test ในการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแบคทีเรียจากทั้ง 2 วิธี และ McNemar test ในการเปรียบเทียบความสามารถของ Selective-enrichment broth ในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่า

ผลการทดลอง

จำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่นับได้จากวิธี MPN และ Total bacteria count จำนวน 62 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนเชื้อที่นับได้จากทั้ง 2 วิธีนี้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.075) และความสามารถในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าของ Rappaport-Vassiliadis broth และ Tetrathionate broth ที่ใช้ในวิธี MPN จากตัวอย่างเชื้อซัลโมเนลล่าที่ให้ผลเป็นบวกจำนวน 444 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.773) โดยความสามารถในการตรวจพบเชื้อของอาหารแต่ละชนิดคือร้อยละ 98.87 (439/444) และร้อยละ 97.42 (437/444) ตามลำดับ (Table 1, 2)

Table 1 Number of test sort by difference count of bacteria by using 2 methods.

Different count of bacteria between Total bacteria count and MPN methods	Number of Sample
Equal or less than 10 cells	12
11 - 50 cells	32
51 - 100 cells	3
More than 100 cells	15
	62

Table 2 Detection of *Salmonella* spp. by using selective liquid medium.

	Positive (%)	Negative (%)
Rapaport-vassiliadis broth	439 (98.87)	5 (1.13)
Tetrathionate broth	437 (97.42)	7 (2.58)

สรุปและวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า วิธี MPN สามารถนำมาใช้ในการวัดจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับวิธี Total bacteria count ที่เป็นวิธีนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยตรง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี MPN นี้สามารถใช้ในการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่มีเชื้ออยู่ในตัวอย่างน้อย หรืออาจจะนำมาใช้กับในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณมาก เช่น หาปริมาณเชื้อในน้ำจากแม่น้ำ (Kaper et al., 1977) และยังมีรายงานว่าวิธี MPN สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่อ่อนแอ ที่ต้องมีการเพิ่มจำนวนใน Pre-enrichment (Resuscitation state) ก่อนได้ (Cui et al., 2005) นอกจากนั้นการวัดจำนวนด้วยวิธี MPN ยังช่วยให้ผลที่ออกมาใกล้เคียงกับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่มีอยู่จริงในตัวอย่างเนื่องจากมีการใช้ Selective-enrichment broth และ Selective-enrichment agar ในการยืนยันผลว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลล่าจริง ซึ่งดีกว่าการใช้วิธี Total bacteria count ที่ต้องอาศัยความชำนาญในการแยกโคโลนีของเชื้ออื่นที่ไม่ใช่เชื้อซัลโมเนลล่าออกก่อนแล้วจึงค่อยนับโคโลนีที่เป็นเชื้อซัลโมเนลล่าได้

การตรวจหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MPN พบว่าที่ confidence interval เท่ากับ 95% การนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีนี้ หากมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียอยู่ 400 เซลล์ ค่าที่วัดได้จากวิธีนี้จะอยู่ระหว่าง 385 ถึง 415 เซลล์ (Cuniff, 1998) แต่จากการทดลองพบว่าจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าที่นับได้บางครั้งมีค่าที่น้อยกว่าช่วงที่กำหนดไว้นี้ ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลจากคุณสมบัติของ Selective-enrichment broth เพราะในการใช้วิธี MPN ผลที่อ่านได้จาก BPW จะนำไปเทียบได้ก็ต่อเมื่อมีการยืนยันผลว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลล่าจริง ซึ่งหากมีเชื้ออยู่แต่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่สามารถตรวจได้ ผลที่ออกมาก็จะน้อยกว่าความเป็นจริง ซึ่งอาหารที่นำมาใช้บางครั้งอาจไม่เหมาะสมกับการตรวจนับเชื้อซัลโมเนลล่าบางชนิด ทำให้ได้การแปลผลที่ผิดพลาด เช่น *Salmonella* Enteritidis หากใช้ RV ในการตรวจจะตรวจพบได้น้อยกว่าการใช้ TT ที่อุณหภูมิในการบ่มเดียวกันคือ 42 องศาเซลเซียส (Michael et al., 2003) แต่ TT ไม่สามารถตรวจเชื้อ *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Paratyphi ได้ (อิงอร และอุบลรัตน์, 2547) ซึ่งในส่วนนี้ไม่ได้มีการทดลองในการทดลองนี้ ดังนั้นหากต้องการจะใช้วิธี MPN ในการตรวจต้องทราบคุณสมบัติของอาหารแต่ละชนิดในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย และควร

ใช้อาหาร 2 ชนิดเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการตรวจ นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าวิธี MPN มีข้อเสียคือ ต้องใช้แรงงานในการทำการทดลองมาก ความสามารถในการตรวจจำกัดที่การตรวจเชื้อที่ปริมาณหนึ่งเท่านั้น เช่น ไม่เกิน 1,100 MPN/ml สำหรับการทำ 3-tube MPN ซึ่งหากในตัวอย่างที่ส่งมาตรวจมีจำนวนเชื้อที่มากกว่านี้ก็ต้องมีการเปลี่ยนวิธีอื่นมาใช้ในการตรวจ และมีรายงานว่าความแม่นยำในการตรวจจะต่ำ ยกเว้นมีการใช้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียหลายๆ ค่าในการทดสอบ (McMeekin, 2003)

ผลที่ได้จากการใช้ Selective-enrichment broth ทั้ง 2 ชนิดคือ RV และ TT ในวิธี MPN ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.773$) เมื่อคำนวณผลที่ได้ด้วยค่าทางสถิติ ทำให้สามารถเลือกใช้อาหารทั้ง 2 ชนิดนี้ในการทดสอบหาเชื้อซัลโมเนลล่าได้ แต่หากดูจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกของอาหารทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกันแล้ว จะพบว่า RV มีความสามารถในการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลล่ามากกว่า TT ซึ่งตรงกับที่เคยมีการทดลองก่อนหน้านี้ว่า RV ที่บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าได้ดีกว่า TT ที่มีการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่หากมีการปรับอุณหภูมิของ TT มาบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส มีรายงานว่าให้ผลในการตรวจเชื้อซัลโมเนลล่าได้ดีกว่า RV ที่บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน (อิงอร และอุบลรัตน์, 2547) และนอกจากนั้นความสามารถในการตรวจยังขึ้นอยู่กับชนิดของ Selective enrichment agar ที่นำมาใช้กับ Selective-enrichment broth แต่ละชนิดด้วย เช่น หากมีการใช้ RV กับ Xylose Lysine Tergitol 4 agar (XLT4 agar) และ BPLS agar จะให้ผลในการตรวจเชื้อซัลโมเนลล่าได้จำเพาะมากกว่าการใช้ TT (Michael et al., 2003) ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้อาจจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าที่ให้ผลบวกในการทดลองนี้ด้วย RV ที่บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสให้ผลที่ดีกว่า TT ที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่หากจะให้ทำการสรุปความสามารถของ RV และ TT ที่นำมาใช้ในวิธี MPN และทำการบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 42 องศาเซลเซียสแล้ว ในที่นี้ก็ยังสรุปไม่ได้ว่าอาหารชนิดใดจะให้ผลได้ดีกว่ากัน เพราะไม่ได้มีการทดสอบในการทดลองนี้ ดังนั้นหากต้องการทราบอาจต้องทำการทดสอบเพิ่มเติม โดยอาจทำการเปรียบเทียบโดยใช้ Selective enrichment agar ที่แตกต่างกันร่วมด้วย เพื่อใช้วิเคราะห์ความสามารถของ RV และ TT แต่ละชนิด รวมทั้งหาอาหารชนิดแข็งที่เหมาะสมกับ RV กับ TT ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้มอบทุนในการทดลองให้กับงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ สพ.ญ.นัทธิณี กิตติวรรณ และสพ.ญ.อาภาพรรณ วรรณคำ สำหรับเชื้อ *Salmonella* Rissen ที่นำใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณอาจารย์สาขาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตรวจแก้ไข และวิเคราะห์

ข้อมูลจากการทดลอง และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ นิ่มตระกูล. 2544. ความชุกของการติดเชื้อซัลโมเนล่าของอิกัวน่าเขียว *(Iguana iguana)* ณ สวนสัตว์เชียงใหม่ [วิทยานิพนธ์]. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

เกสร บุญยรักษ์โยธิน และสุภาภรณ์ นิยมแก้ว. 2546. ซีโรทัยป์ของเชื้อซัลโมเนลล่าที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดสงขลา ตรัง ชุมพร พังงา และภูเก็ต ปีพ.ศ. 2545. วารสารวิชาการสาธารณสุข 12(5):กันยายน – ตุลาคม.

นลินี อัศวโภคี ชุษณา สวนกระต่าย ธวัชชัย จริยะเศรษฐพงศ์ เพลินจันทร์ เชษฐ์โชติศักดิ์ และพรรณทิพย์ ฉายากุล. 2544. โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก 2. โฮลิสติก พับลิชชั่ง. กรุงเทพมหานคร. หน้า 302–309.

ศนิกานต์ ทองสวัสดิ์. 2545. การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อไก่สดที่จำหน่ายในเขตเทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ [วิทยานิพนธ์]. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

อาภาพรรณ วรรณคำ. 2547. การศึกษาแหล่งที่มาของเชื้อซัลโมเนลล่าที่ตรวจพบในสุกรขุน [วิทยานิพนธ์]. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และสุมาลี บุญมา. 2546. การสำรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารพร้อมปรุงที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาร์เก็ตจากเขตพื้นที่ 3 จังหวัด. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

อิงอร สาธุวงษ์ และอุบลรัตน์ แทนกลาง. 2547. การเปรียบเทียบวิธี NIAH-THAI-2001 กับวิธีมาตรฐาน ISO 6579 ในการเพาะเชื้อ *Salmonella* จากตัวอย่างจากสัตว์. ประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 ระหว่างวันที่ 10 - 12 พฤศจิกายน 2547. กรุงเทพมหานคร.

Bell, C. and Kyriakides, A. 2002. Salmonella. MPG Books Ltd, Bodmin.

Cui, Z., Wang, P. and Wang, Q. 2005. Application effect of most probable number (MPN) method in photosynthetic bacteria counting. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 16(8): 1577-1580.

Cuniff, P. 1998. Official methods of analysis of AOAC international volume 1(2). 16th ed. AOAC international, Gaitherburg.

Kaper, J.B., Sayler, G.S., Baldini, M.M. and Colwell, R.R. 1977. Ambient-temperature primary nonselective enrichment for isolation of *Salmonella* spp. from an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 33(4): 829-835.

McMeekin, T.A. 2003. Detecting Pathogens in Food. Woodhead publishing, Cambridge.

Michael, G.B., Simoneti, R., Costa, M.D. and Cardoso, M. 2003. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella sp.* From feces of finishing swine. Brazilian Journal of Microbiology 34: 138-142.