รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็ว ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก

Innovation rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802220

สัญญาเลขที่ 22/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็ว ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก

Innovation rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export

ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์

สำนักงานจัดการศึกษา คณะวิศวกรรมศาสตร์

ธันวาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 22/2560

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การบูรณาการภาพรวมของชุดการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาอย่างรวดเร็วในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยกระดับมาตรฐานการส่งออก (ภาษาอังกฤษ) Innovation rapid *Salmonella* identification to assure high quality with the emphasis on world-class quality for export รหัสโครงการ 2560A10802220 สัญญาเลขที่ 22/2560 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 1,004,000 บาท (หนึ่งล้านสี่พันบาทถ้วน) ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2559 – วันที่ 30 กันยายน 2560) โดยผลการดำเนินงานทางคณะผู้วิจัยได้ทำการบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. เนื่องจากเกิดการแพร่ระบาดของ *Salmonella* ที่เกิดขึ้นในหลายแห่งและมีการปนเปื้อนที่มากับวัตถุดิบในการผลิตอาหารส่งผลกระทบทำให้ผู้บริโภคเกิดการเจ็บป่วยจากการติดเชื้อท้องร่วงอย่างรุนแรง อาการโลหิตเป็นพิษ ผลิตภัณฑ์ของโรงงานอุตสาหกรรมถูกตีกลับ สูญเสียรายได้มูลค่ามหาศาล ดังนั้น**การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็วและแม่นยำก่อนอาหารจะถูกส่งไปยังผู้บริโภคเป็นวิธีการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์ในปัจจุบัน**ยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก นอกจากนี้มีการนำเทคโนโลยีชั้นสูง เช่น เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน **ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้นและมีค่าใช้จ่ายสูง** เนื่องจากชุดทดสอบนี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยจึงบูรณาการวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ด้วยการพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้ชนิดใหม่ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟต์ของซัลโมเนลลา ร่วมกับการตรวจสอบปฏิกริยาด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารบ่งชี้จำเพาะด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นและใช้ในการคัดเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุด จากการเปรียบเทียบปริมาณการเกิดปฏิกริยาของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ สำหรับความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการ

บ่งชี้ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโนและการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ คือที่ 550 (ใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์) และ 650 (ใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท เป็นอินดิเคเตอร์) นาโนเมตร ตามลำดับ โดยในงานวิจัยนี้มีการศึกษาชนิดของตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถเกิดปฏิกริยาอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นโดยเฉพาะไลซีนและออร์นิธิน นอกจากนี้ในงานวิจัยยังมีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการตรวจวิเคราะห์ซัลโมเนลลาที่สามารถเกิดปฏิกริยาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟต์ โดยในงานวิจัยมีการศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการเพิ่มความสามารถในการคัดแยกเชื้อ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทั้ง 2 ปฏิกริยาประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate ที่ลดปริมาณการใช้อาหารแต่ยังคงให้ผลสอดคล้องกับวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ทำให้สามารถวิธีเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ทีละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ในการทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ได้นำสูตรอาหารเหลวกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นที่ได้ชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสมทำการทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริงพบว่า สูตรอาหารดังกล่าวให้ประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นในระดับไมโครสเกล (RapidSAL) เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้นในผลิตภัณฑ์อาหารและในบริเวณผลิตอาหาร โดยมีการพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้ชนิดใหม่ที่อาศัยหลักการของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโน (ออร์นิธิน และ/หรือ ไลซีน) และความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของซัลโมเนลลา ซึ่งสามารถบ่งชี้การปนเปื้อนได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวในตัวบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม การอ่านผลโดยรวมจากอาหารเหลวบ่งชี้สูตรที่ใช้กรดอะมิโนทั้งที่มีส่วนผสมของสารยับยั้งในปริมาณที่เหมาะสม ร่วมกับสูตรที่ใช้ไทโอซัลเฟตเป็นสารตั้งต้นนั้น ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มซัลโมเนลลาที่สามารถใช้กรดอะมิโนและไทโอซัลเฟตออกจากกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้กรดอะมิโนและไทโอซัลเฟตได้ เมื่อตรวจวัดสมบัติทางแสงของระบบบ่งชี้แต่ละชนิดในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาโดยวิธีทางสเปคโตรโฟโตรเมตรีด้วยการใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 550 (ใช้ฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์) และ 650 (ใช้เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรทเป็นอินดิเคเตอร์) นาโนเมตร ตามลำดับ ในการพัฒนาสูตรอาหารเหลวสำหรับบ่งชี้เบื้องต้นของชนิดกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลส พบว่าสารยับยั้งของอาร์วีเอส ($MgCl_2$ anhydrous 28.6 g/L ร่วมกับ malachite green 36 mg/L) หรือสารยับยั้ง $MgCl_2$ 50 g/L นั้น มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาและสามารถคัดเลือกซัลโมเนลลาจากเชื้ออื่นๆ ได้ดีที่สุด ทั้งในการทดลองกับเชื้อบริสุทธิ์และตัวอย่างอาหาร นอกจากนี้การตรวจสอบสมบัติทางสเปกโตรโฟโตเมตรีในอาหารเหลวบ่งชี้กลุ่มกรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลส ยังสามารถบ่งบอกการเกิดปฏิกิริยาในแบคทีเรียที่ปนเปื้อนโดยไม่เกิดความคลาดเคลื่อนจากความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียและอนุภาคของอาหารอีกด้วย สำหรับการทดลองพัฒนาสูตรอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้นชนิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ ที่มีองค์ประกอบเป็นไทโอซัลเฟตเป็นหลักนั้น พบว่าในการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สูตรอาหาร TFTOA (องค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไทโอซัลเฟต เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท ทรีฮาโลส ออร์นิธิน และอาร์จินีน) มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มการเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์และค่า OD_{650} ใน *Salmonella* Typhi และ *Salmonella* Anatum และค่อนข้างสูงในซัลโมเนลลาซีโรวาร์อื่นๆ ที่สามารถใช้ไทโอซัลเฟตได้ ในขณะที่ซัลโมเนลลาซีโรวาร์ทั่วๆ ไป สร้างตะกอนสีดำได้ในปริมาณมากในสูตร TFXOA แต่ *S.* Typhi และ *S.* Anatum นั้นสร้างตะกอนสีดำได้น้อย นอกจากนี้ สูตรอาหารทั้งสองยังมีความจำเพาะในการคัดเลือกซัลโมเนลลาจากแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ มากกว่าอาหารในปัจจุบัน เพราะสามารถแยก *Citrobacter freundii* และ *Proteus vulgaris* ออกได้ เมื่อนำวิธีการตรวจวิเคราะห์หาซัลโมเนลลารูปแบบใหม่

หรือ RapidSAL นี้ มาทดสอบกับตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนจากอุตสาหกรรมจำนวน 14 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับผลจากวิธีการมาตรฐาน ISO 6579:2002 พบว่าผลการทดสอบจากวิธีการวิเคราะห์ทั้ง 2 มีความสอดคล้องและเทียบเท่ากัน (Cohen KAPPA = 1) ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าวิธีการใหม่ในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้น หรือ RapidSAL นี้ สามารถตอบโจทย์เป้าหมายของงานวิจัย คือ มีความสะดวกในการวิเคราะห์ และให้ผลการทดลองรวดเร็ว โดยให้ผลเบื้องต้นในอาหารเหลวในวันแรกของการทดสอบ และให้ผลเบื้องต้นครั้งที่สองบนอาหารแข็งในวันที่สอง ในขณะที่วิธีการมาตรฐานนั้นจำเป็นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3 วัน สำหรับให้ผลการทดสอบเบื้องต้นครั้งแรก

คำสำคัญ: การตรวจวิเคราะห์หาซัลโมเนลลา / การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ / ดีคาร์บอกซีเลชั่นของกรดอะมิโน / ตัวอย่างอาหารในอุตสาหกรรม / ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม / อาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้น

บทคัดย่อ

A screening protocol of *Salmonella* spp. was developed to test both finished ready-to-eat food products and swab samples collected during food processing. Our rapid microscale assay (RapidSAL) uses an array of new presumptive indicator in the enrichment step. The new indicator broths are based on amino acid decarboxylation (AADC) (i.e., ornithine and/or lysine) and hydrogen sulfide (H_2S) production. The presence of *Salmonella* is indicated by clear changes of broth color. Collectively, the broth formulations with different amino acids with optimized selective inhibitors and thiosulfate as sulfur substrates could distinguish between decarboxylase and thiosulfate reductase-positive salmonellae and reductase-negative non-salmonellae. Spectrophotometrically, the highest difference in absorbance between broths spiked with *Salmonella* spp. and non-salmonellae were at 550 nm (phenol red) and 650 nm (ferric ammonium citrate) for AADC and H_2S production, respectively. For inhibitory agents in AADC media, $MgCl_2$ anhydrous 28.6 g/L and malachite green 36 mg/L (RVS inhibitors), or $MgCl_2$ 50 g/L was chosen for good recovery and high selectivity in both pure culture and food samples. The optimized thiosulfate-based broth, named TFTOA (thiosulfate, ferric ammonium citrate, trehalose, ornithine, and arginine), effectively increased black precipitates and OD_{650} of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Anatum, and displayed good sensitivity for other thiosulfate – reducing *Salmonella,* while TFXOA broth within 24 h showed high sensitivity for typical *Salmonella*, but low for *S.* Typhi and *S.* Anatum. These developed H_2S broths had more selectivity than the conventional media since the common false positive competitors (*C. freundii* and *P. vulgaris*) could be distinguished. Comparison between ISO 6579:2002 and our RapidSAL protocol was performed using 14 naturally-contaminated industrial food and swab samples. The results of the RapidSAL protocol agreed well with the ISO method (Cohen KAPPA = 1). RapidSAL satisfied our main research goals of no false negative results, high throughput, and rapid analytical time; first presumptive result on day 1 and second presumptive result on day 2, in contrast to the conventional method that requires 3 days for the first presumptive result.

Keywords: Amino acid decarboxylation / Hydrogen sulfide production / Industrial food sample / Presumptive broth / Salmonella detection / 96-well microplate

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	II
บทคัดย่อ	IV
สารบัญเรื่อง	VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	XI
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	9
3 วัสดุอุปกรณ์และการดำเนินงานวิจัย	31
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	43
5 สรุปผลการทดลอง	87
เอกสารอ้างอิง	89
ผลผลิต (output)	96
ประวัติคณะผู้วิจัย	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี 1973-1978	19
2.2	แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการกระตุ้นและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*	21
2.3	ปฏิกริยาชีวเคมีของ Salmonella	25
2.4	การทดสอบยืนยันเชื้อ Salmonella	26
2.5	วิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหา Salmonella ที่ได้รับการับรองโดย AOAC	28
4.1	การ recovery ของเชื้อ typical และ atypical ของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวมาตรฐาน 3 ชนิด: MKTTn, Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth; SC, selenite cysteine broth; RVS, Rappaport – Vassiliadis soy broth จำนวนในคอลัมน์เป็นค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ± SEM, N = 3 หลังจาก 24 ชั่วโมงใน selective broth	46
4.2	ผลของตัวยับยั้งที่ได้จากสูตรอาหารมาตรฐานต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่ Salmonellae (ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/ml) ในอาหารเหลว mLDB-PR (L) และ mODB-PR (O) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรสำหรับปฏิกริยาการใช้ไลซีนและออร์นิธิน (+, ผลบวก, A_{550} ของตัวอย่าง $>$ A_{550} ของ control; -, ผลลบ, A_{550} ของตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ของ control) ที่ปรากฏใน Salmonellae และเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonellae แกรมลบ ตัวอย่างควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ	54
4.3	ผลของตัวยับยั้งเดี่ยวในอาหารเหลวจำเพาะถูกใช้ในการอธิบายกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (+, ผลบวก, A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม; -, ผลลบ, A_{550} ตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ควบคุม) สะท้อนให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของ Salmonellae และที่ไม่ใช่ Salmonellae (7 log CFU/ml) ในอาหารเหลว mLDB-PR (L) และ mODB-PR (O) ที่การบ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ	58
4.4	สรุปความสามารถในการ selectivity ของอาหารเหลว 7 ชนิดที่ได้มีการพัฒนาซึ่งมีการ inoculated ในแต่ละอาหารด้วยเชื้อ salmonellae และที่ไม่ใช่ salmonellae ด้วยปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	59

ตารางที่		หน้า
4.5	ปริมาณเชื้อจำกัด (detection limit) ในอาหารเหลวจำเพาะที่นำเสนอ AADC สำหรับเชื้อที่เป็น typical และ atypical *Salmonella* ซีโรวาร์ บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความสามารถในการ detectability อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงใน A_{550} ของอาหารเหลวที่มีเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ). +, สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม); -, ไม่สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง = A_{550} ควบคุม); x, ไม่สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ควบคุม) เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ไลซีนและออร์นิทีนดีคาร์บอกซีเลส	61
4.6	การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่มีการ spiked และมีเชื้อโดยธรรมชาติในอาหารเหลว 7 AADC สำหรับการคัดเลือกจำเพาะและ simultaneously detection ของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลส. x, ไม่มี; ✓, มี; -, ผลลบ DC, +, ผลบวก DC. Control ถูกสอดคล้องกับตัวอย่างอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ	65
4.7	แสดงความสามารถในการคัดเลือกเชื้อของอาหารไทโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท ในอาหารเหลว TFX ที่มีการเติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น ไลซีน (L), ออร์นิทีน (O), และอาร์จินิน (A) ที่ใส่เชื้อด้วย Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonellae ที่ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/ml ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ให้ผลที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม)	70
4.8	ค่าการดูดกลืนแสงของ *Salmonella* ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ของ *Salmonella* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml ในอาหารเหลว TFOA ที่มีหรือไม่มีไซโลสหรือทรีฮาโลส (คัดเลือกจากการใช้น้ำตาล 19 ชนิด) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	72
4.9	แสดงการคัดเลือกเชื้อของอาหารไทโอซัลเฟต-เฟอริก แอมโมเนียมซิเตรทของอาหาร TFLOA ที่มีการเสริมด้วยไซโลส (ตัวอย่างควบคุม), ดูซิทอล, หรือแมนนิทอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการใส่เชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ปริมาณ 7 log CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และสังเกตด้วยตาที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการบ่ม	73
4.10	ผลของอาหารเดี่ยวและผลรวมการใช้อาหารทั้ง 8 presumptive ที่บ่งบอกการเปลี่ยนสีในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. เป็นการตัดสินใจด้วยสายตาในตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างจากกระบวนการผลิตและตัวอย่างควบคุมที่ 12 ชั่วโมงของการเพิ่มจำนวนเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างอ้างอิงที่ได้จากการทดสอบด้วย PCR	82

ตารางที่		หน้า
	ทดสอบ	
4.11	ผลของอาหารเดี่ยวและผลรวมการใช้อาหารทั้ง 8 presumptive ที่บ่งบอกการเปลี่ยนสีในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. เป็นการตัดสินใจด้วยสายตาในตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างจากกระบวนการผลิตและตัวอย่างควบคุมที่ 24 ชั่วโมงของการเพิ่มจำนวนเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างอ้างอิงที่ได้จากการทดสอบด้วย PCR	83
4.12	ผลการทดลองการยืนยันเชื้อ Salmonella โดยการใช้เทคนิค RapidSAL เปรียบเทียบกับ ISO protocol ในตัวอย่างอุตสาหกรรม 14 ตัวอย่าง RapidSAL ถูกประกอบไปด้วยการ presumptive enrichment ใน 8 อาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ subsequently ลงบนอาหารแข็ง XLD และ ABC ที่บรรจุอยู่ใน 96-well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 24 ชั่วโมง โปรโตคอล ISO ใช้ในขั้นตอน non-selective enrichment (24 h), ขั้นตอนการคัดเลือกจำเพาะ (24 ชั่วโมง) และ selective plating (24 ชั่วโมง)	84

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	(ก) พบการระบาดของเชื้อโรคซาลโมเนลลาเนื่องจากการบริโภคข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยรวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ 400-500 คน โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมากขึ้น ดังนั้นการรับประทานข้าวมันไก่ควรกินที่ปรุงเสร็จภายในไม่เกิน 4 ชั่วโมง ข้าว ไก่ ต้องร้อน รวมทั้งเลือดต้องต้มให้สุก (ข) นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ โรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนบริโภค โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากผลการตรวจไข่ต้ม รวมทั้งสารคัดหลั่ง ทั้งอุจจาระและเลือดนั้นพบการปนเปื้อนของ "ซัลโมเนลลา"	2
2.1	แฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (ก) และลักษณะของเชื้อ *Salmonella* เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)	10
2.2	แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม	20
2.3	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างกัน	24
2.4	แสดงลักษณะของเชื้อ Salmonella ในขั้นตอนทางชีวเคมี	26
3.1	Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า	34
3.2	แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA	35
3.3	แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA	36
4.1	(a) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของอาหารเหลว mLDB-PR (●), mDB-PR (×, control สำหรับความขุ่นของเซลล์) ที่ใส่เชื้อด้วย *S.* Anatum (6 log CFU/ml) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ กันหลังจากเพาะบ่มเชื้อแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงคิดจากค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างที่มีความขุ่น (O = ● − ×) ได้ถูกคำนวณและพล็อตกราฟในแต่ละเวลา ในแต่ละจุดของข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± SEM ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่ได้หักออก (●), และค่าการดูดกลืนแสงที่หักออก (O) ที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มี	50

รูปที่ **หน้า**

ไม่ได้หักออก (●), และค่าการดูดกลืนแสงที่หักออก (O) ที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$).

(b) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของอาหารเหลว mLDB-PR ที่ใส่เชื้อด้วย *S.* Anatum (6 log CFU/ml) ที่เวลาในการบ่มเชื้อต่างกัน แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± SEM ที่เวลาจำเพาะ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ได้เหวี่ยงแยก, (●) และที่เหวี่ยงแยก, (O) ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$). 50

4.2 A_{550} ค่า absorbance เทียบกับเวลาของตัวอย่างนมที่ spike และไม่ spike ด้วยแบคทีเรียปริมาณ 10 CFU ต่อตัวอย่าง 25 ml แต่ละข้อมูลมาจากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± SEM ตัวอย่างถูกบ่มในอาหารจำเพาะ OMC ที่อุณหภูมิ 37 °C นมปราศจากเชื้อถูก spiked ด้วย *S.* Typhimurium (●), ODC-positive *E. coli* (□), ODC-negative *P. vulgalis* (◊), นมปราศจากเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อ (O), อาหารเหลว OMC ที่ไม่มีการเติมเชื้อ (×). 66

4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรเทียบกับเวลาของเชื้อ *Salmonellae* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml; (A) *S.* Enteritidis (B) *S.* Anatum และ (C) Typhi, และทำการเติมเชื้อลงในไธโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหาร TFX ที่มีการ supplemented ด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไปของไลซีน (TFXL), ออร์นิทีน (TFXO), และอาร์จินิน (TFXA) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในแต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM, n = 3. 70

4.4 ไดอะแกรมแสดงเทคนิค MDPT ที่ประกอบไปด้วยเซ็ทอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella ใน 96-well microplate มีการใช้เทคนิคกล้องดิจิตอล microscopic ในการพัฒนาตรวจนับโคโลนีของ Salmonella บนอาหารจำเพาะแข็ง 78

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

แบคทีเรียซัลโมเนลลา (*Samonella*) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ แบคทีเรียซัลโมเนลลา (*Samonella*) จัดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากอาหารสู่คนที่มีความสำคัญเป็นลำดับต้น ๆ สามารถก่อโรคติดเชื้อทั้งในระบบทางเดินอาหารและกระแสเลือด ปัจจุบันเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขมูลฐานทั้งในประเทศอุตสาหกรรมและประเทศกำลังพัฒนาเป็นอย่างมาก นอกจากนี้เชื้อ *Salmonella* ยังมีความสำคัญในด้านเศรษฐกิจอุตสาหกรรมอาหารส่งออกของประเทศไทย ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ตามสถิติการส่งออกในรอบสี่ปี (2551 - 2554) ที่ผ่านมาปรากฏว่าอุตสาหกรรมอาหารส่งออกสินค้าประมงทำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งคิดเป็นมูลค่า 80,654.03, 134,667.82, 135,610.94, 71,724.26 ล้านบาท (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2012) เมื่อพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารย่อมทำให้ประเทศที่รับสินค้าปฏิเสธสินค้า ก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจการส่งออกได้ มีรายงานจากประเทศนอร์เวย์ระหว่างปี ค.ศ. 1982 – 1986 มีผู้ป่วย 186 ราย (อัตราป่วย 4.50 คนต่อประชากร 100,000 คน) ร้อยละ 61.8 ของผู้ป่วยนั้นติดเชื้อภายหลังจากเดินทางกลับจากต่างประเทศ ในปี ค.ศ. 1987 ประเทศนอร์เวย์และฟินแลนด์ เกิดการระบาดของ *S.typhimurium* สาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อในช็อกโกเลต (Kapperud และคณะ, 1990) ในปี ค.ศ. 1992 Torensma และคณะได้ทำการศึกษาและค้นคว้า พบว่าจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ปริมาณน้อยกว่า 10 เซลล์ในช็อกโกแลต 100 กรัม สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคได้ จากการศึกษาของเกรียงศักดิ์ สายธนู และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ ในปี 2541 ได้ประมาณจำนวนผู้ป่วย Salmonellosis จากโรคอุจจาระร่วง โรคอาหารเป็นพิษ โรคบิด โรคไข้แอนเทซิสและโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งพบว่าเมื่อปี 2550 – 2555 มีจำนวนถึง 45,192 – 632,684 ราย หรือคิดเป็น 76-1,057 รายต่อประชากรหนึ่งแสนคน

จากรายงานข่าวล่าสุดของการติดเชื้อ *Salmonella* ปี 2557 ในประเทศไทยที่จังหวัดเชียงใหม่ มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยจากการรับประทานข้าวมันไก่รวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ

400-500 คน ทั้งหมดมีอาการติดเชื้อโรคซัลโมเนลลา ทั้งนี้เนื่องจากเนื้อไก่และเลือดไก่บูดเน่าได้ง่าย โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมากขึ้น การรับประทานข้าวมันไก่ที่มีการติดเชื้อดังกล่าวเมื่อร่างกายรับเชื้อ เชื้อโรคจะมุ่งเข้าสู่เซลล์น้ำเหลืองของลำไส้เล็ก และจะเจริญแบ่งตัวที่นั่น แต่ยังไม่มีอาการ เพราะเป็นระยะฟักตัว หลังจากนั้นเชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดกระจายสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย และเริ่มแสดงอาการหลังบริโภคประมาณ 6-48 ชั่วโมง มีอาการอยู่ในระหว่าง 1-5 วัน นอกจากนี้ยังมีเหตุการณ์ในทำนองเดียวกันเกิดขึ้นโดยพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในไข่ต้มที่นำมาให้นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ ทำให้เด็กนักเรียนโรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานอาหารไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากการได้รับเชื้อ **"ซัลโมเนลลา"**

รูปที่ 1.1 (ก) พบการระบาดของเชื้อโรคซาลโมเนลลาเนื่องจากการบริโภคข้าวมันไก่ โดยพบผู้ป่วยรวม 6 ครั้ง ระบาดครั้งละ 400-500 คน โดยเฉพาะในช่วงนี้ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนมากขึ้น ดังนั้นการรับประทานข้าวมันไก่ควรกินที่ปรุงเสร็จภายในไม่เกิน 4 ชั่วโมง ข้าว ไก่ ต้องร้อน รวมทั้งเลือดต้องต้มให้สุก (ข) นักเรียนที่จังหวัดเชียงใหม่ โรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงพร้อม ๆ กันจำนวนมาก เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงนำส่งโรงพยาบาลกว่า 500 คน หลังจากที่รับประทานไข่ต้ม ซึ่งได้รับบริจาคจากผู้ที่นำไข่ไปแก้บน แล้วนำมาให้นักเรียนรับประทาน โดยไม่ผ่านการให้ความร้อนก่อนบริโภค โดยอาการของเด็กส่วนใหญ่มีอาการโลหิตเป็นพิษ จากผลการตรวจไข่ต้ม รวมทั้งสารคัดหลั่ง ทั้งอุจจาระและเลือดนั้นพบการปนเปื้อนของ "ซัลโมเนลลา"

จากการแพร่ระบาดของ *Salmonella* ที่เกิดขึ้นในหลายแห่งทำให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารประเภทนี้มีอยู่ทั่วไป การปนเปื้อนที่มากับวัตถุดิบในการผลิตอาหารเป็นปัจจัยหลักในการแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้ โรงงานอุตสาหกรรมอาหารขนาดใหญ่และโรงงานส่งออกอาหารและผลิตสินค้าแปรรูปเกษตรขนาดกลาง-เล็กในประเทศไทยจึงมีโอกาส**ประสบปัญหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในโรงงานอาหารส่งออก เช่น โรงเชือดไก่ หรือแปรรูปเนื้อไก่ส่งออก รวมถึงโรงงานผลิตอาหารพร้อมรับประทานแช่แข็งส่งออก (Frozen ready-to-eat manufacturers) ด้วยกันทั้งนั้น** ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญมากในการตรวจสอบและป้องกันปัญหาดังกล่าวก็คือ **การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารอย่างรวดเร็วและแม่นยำก่อนอาหารจะถูกส่งไปยังผู้บริโภคเป็นวิธีการป้องกันปัญหาการแพร่ระบาดของซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามในการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจสอบซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารให้มีประสิทธิภาพสูงสุด** ซึ่งในปัจจุบันจะมีวิธีทดสอบที่รวดเร็ว (rapid test) สำหรับแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในอาหารหลายวิธี อย่างไรก็ตามแต่ละวิธียังคงมีปัญหาเกี่ยวกับความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) โดยต้องมีแบคทีเรียซัลโมเนลลาความเข้มข้น 10^4 - 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก นอกจากนี้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มาใช้ตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียซัลโมเนลลาที่เคยมีรายงานมาจะต้องสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อน **ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและเสียเวลามากขึ้นและมีค่าใช้จ่ายสูง** เนื่องจากชุดทดสอบนี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง เช่น Singlepath® SALMONELLA (MERCK, Germany) โดย 1 ชุด สามารถวิเคราะห์ได้ 20 ตัวอย่าง ราคาประมาณ 10,000 บาท (ตัวอย่างละ 500) เป็นต้น ซึ่งชุดตรวจสอบ 1 ชุด จะสามารถตรวจสอบเชื้อได้ชนิดเดียว หากต้องการตรวจสอบเชื้อชนิดอื่นจะต้องซื้อชุดตรวจสอบสำหรับเชื้อนั้น ๆ ใหม่ ในขณะที่**วิธีการตรวจสอบซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารที่อาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture-based method) จัดว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ และได้รับการรับรองจากหน่วยงานอาหารสากลต่างๆ อาทิเช่น องค์กรระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน (International standard organization, ISO) คู่มือการวิเคราะห์แบคทีเรีย (Bacteriological Analytical Manual, BAM) และเอโอเอซี (the Association of Official Analytical Chemists, AOAC) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

นั้น ยังมีข้อเสียคือใช้เวลาในการอ่านผลเบื้องต้นนานถึง 3 วัน ทำให้ไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจสอบอาหารที่มีอายุการเก็บรักษาสั้น (Mcpherson et al., 1991) หรืออาหารที่ต้องการทราบผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว

ดังนั้นการพัฒนาใช้วิธีการอื่นที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและแม่นยำ รวมทั้งมีความไวใกล้เคียง เท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ทั้งนี้เมื่อพิจารณา**ขั้นตอนในการวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาประกอบไปด้วย การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ จากนั้นในขั้นตอนที่สอง นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะซึ่งมีสารยับยั้งหรือลดจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลา แต่ในขณะเดียวกันก็เพิ่มจำนวนซัลโมเนลลา และในขั้นตอนที่สามคือ นำไปคัดแยกบนอาหารแข็งจำเพาะ โดยโคโลนีของซัลโมเนลลาจะให้สีจำเพาะแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น** จาก protocol วิธีการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าขั้นตอนที่มีความสำคัญในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในอาหาร คือ ขั้นตอนที่ 1 และ 2 โดยขั้นตอนที่ 1 ซึ่งเป็นการเลี้ยงในอาหารเหลวไม่จำเพาะ (Pre-enrichment or non-selective enrichment) เพื่อเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาทั้งที่ได้รับบาดเจ็บและไม่บาดเจ็บ เนื่องจากในธรรมชาติสามารถพบซัลโมเนลลาปนเปื้อนอยู่ในปริมาณน้อยมาก อีกทั้งอาจเกิดการบาดเจ็บจากการผ่านกระบวนการการผลิต ใน**ขั้นตอนที่สอง ปัจจุบันอาหารเหลวจำเพาะในขั้นตอนนี้นั้น มีประสิทธิภาพและความแม่นยำแตกต่างกันและมีข้อจำกัดในการคัดเลือกซัลโมเนลลาบางซีโรวาร์ (Serovars) อาทิเช่น อาหารอาร์วีเอส (RVS) หรืออาหารในกลุ่มเดียวกัน อาหารเอ็มเคทีทีเอ็น (MKTTn) หรืออาหารในกลุ่มเดียวกัน ไม่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลา ไทฟี (*S.* Typhi) ในขณะที่ อาหารเอสซี (SC) ไม่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลาในหลายซีโรวาร์ แต่เหมาะสำหรับการคัดเลือกซัลโมเนลลา แกลลินาลั่ม (S. Gallinarum) และซัลโมเนลลา ไทฟี (*S.* Typhi) ดังนั้นมาตรฐานต่างๆจึงแนะนำให้ใช้อาหารอย่างน้อยสองชนิดร่วมกัน ตามชนิดตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนและชนิดซีโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่สงสัย แม้ว่าจะใช้อาหารร่วมกันดังกล่าวแต่การอ่านผลการทดสอบยังคงต้องนำไปคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำเพาะและใช้เวลาอ่านผลเป็นเวลาเพิ่มเติมอีก 1 วันและแม้ว่าจะมีความพยายามปรับปรุงสูตรอาหารให้มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีรายงานการระบาดของซัลโมเนลลาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนซัลโมเนลลาเกิดขึ้นในหลายๆประเทศทั่วโลก** ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าด้วยข้อจำกัดที่เกิดขึ้นในวิธีการวิเคราะห์จะส่งผลกระทบกับความแม่นยำและความถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ซึ่งอาจส่งผลกระทบให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการระบาดของ

การติดเชื้อและส่งผลกระทบภาพรวมของเศรษฐกิจที่มีการตีกลับของสินค้าเนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อที่ปลายทางของผลิตภัณฑ์

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อบูรณาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพโดยอาศัยปฏิริยาทางชีวเคมีของซัลลาโมเนลลา เช่น ปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแข่งขัน เพื่อเพิ่มความจำเพาะของอาหารต่อการตรวจสอบและบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาโดยอาศัยพีเอชอินดิเคเตอร์ การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้โดยประยุกต์ใช้อุปกรณ์ 96-microwell plate เพื่อการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของอาหารโดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) สามารถวัดตัวอย่างได้ครั้งละ 96 ตัวอย่าง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการบูรณาการปัจจัยภาพรวมที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ เพื่อพัฒนาชุดอาหารเหลวจำเพาะที่สามารถบ่งชี้การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาเบื้องต้น ได้อย่างถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ รวมทั้งมีประสิทธิภาพใกล้เคียง เท่ากับหรือดีกว่าวิธีมาตรฐาน (conventional method) หรือวิธีการที่รวดเร็วซึ่งอาศัยหลักการอื่น นับเป็นวิธีการที่จะปฏิรูปการวิเคราะห์ *Salmonella* ในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคได้เป็นอย่างดี ความสำเร็จที่เกิดขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารสำเร็จรูปแช่แข็ง (Frozen ready-to-eat products) โรงเชือดไก่ (Chicken Slaughter house) และโรงงานไก่แปรรูป (Chicken Further Factory) ทำให้สามารถวิธีเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว ถูกต้อง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาก่อนส่งจำหน่าย นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับหน่วยงานที่รับตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สามารถตรวจสอบอาหารได้ทีละหลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน สุดท้ายคือความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มศักยภาพในการประกันความปลอดภัยของอาหารส่งออก

โดยทางคณะผู้วิจัยมีความร่วมมือทางวิชาการกับโรงงานอุตสากรรมอาหารแปรรูปแช่แข็งเพื่อการส่งออก อาทิเช่น บริษัท บูโอโน่ (ประเทศไทย) จำกัด, บริษัท ศิริมานิต จำกัด เป็นต้น ทางบริษัทฯมีความต้องการใช้วิธีการวิเคราะห์และสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพในด้านต่างๆ ข้างต้นมาประยุกต์ใช้ในระบบการควบคุมและประกันคุณภาพของทางโรงงาน ทำให้สามารถวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลล่าในตัวอย่างอาหารสำเร็จรูปแช่แข็งส่งออกของทางบริษัท ซึ่งทางคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าแนวทางการวิจัยดังกล่าวจะสามารถแก้ไขปัญหาและตอบโจทย์ให้กับอุตสาหกรรมในทุกๆด้าน และที่สำคัญที่สุด คือการประยุกต์ใช้วิธีการนี้จะเป็นการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเชิงป้องกัน (Preventive

measures) แทนการแก้ไขปัญหา (Corrective approach) ที่ปลายเหตุดังพบเห็นได้ในสื่อทั่วไปเมื่อเกิดการแพร่ระบาดที่บานปลายแล้ว

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1.2.1 พัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *Salmonella* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) ที่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) มีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมที่มีจำนวนมากและรวดเร็ว

1.2.2 ปรับชุดตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์สำเร็จรูปและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ในปริมาณมากโดยการประยุกต์ใช้ 96 – well microplate และให้ผลวิเคราะห์ภายในเวลา 24 ชั่วโมงโดยให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำเทียบเท่าวิธีการมาตรฐาน

1.2.3 เพื่อลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* สำหรับอุตสาหกรรมของไทยทำให้สามารถลดการนำเข้าชุดวิเคราะห์เชื้อสำเร็จรูปและสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารได้มากขึ้นและบ่อยครั้งขึ้น

1.2.4 พัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานเพื่อให้สามารถตรวจวิเคราะห์และตรวจนับการปนเปื้อนได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเพื่อเป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันของซัลโมเนลลาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสม ที่สามารถจำแนกซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆได้ โดยอาศัยการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนสีของอาหาร

1.3.2 ศึกษาปัจจัยในการบ่มเพาะเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาความสามารถในการใช้กรดอะมิโน

1.3.3 ทดสอบการใช้อาหารเหลวจำเพาะที่มีการพัฒนาโดยใช้ระบบการเกิดสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนกับตัวอย่างอาหารจากท้องตลาดและอุตสาหกรรมอาหาร โดยสอบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะร่วมกับวิธีการใหม่ที่อาศัยหลักการการลดขนาดของอาหารและตัวอย่าง (Miniaturization) ผ่านการประยุกต์ใช้ 96 – well microplate กับวิธีการมาตรฐานในการวิเคราะห์ซัลโมเนลลาในปัจจุบัน โดยอาศัยค่าการคำนวณทางสถิติช่วยในการวิเคราะห์ผล

1.3.4 นำเสนอรูปแบบวิธีการวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา (protocol) ตั้งแต่ต้นกระบวนน้ำ เพื่อให้เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารที่ครอบคลุมทั้งกระบวนการผลิตเพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ได้องค์ความรู้ใหม่ในการปฏิรูปการวิเคราะห์ซัลโมเนลลาโดยพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนด้วยการทดแทนด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรที่หาได้ในประเทศไทยร่วมกับเทคนิคการประยุกต์ใช้ สเปกโตรโฟโตเมตรีเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสจากการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจำเพาะ และเป็นพื้นฐานความรู้ในการพัฒนาสร้างนวัตกรรมชุดตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น

1.4.2 เพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแนวทางในการต่อยอดไปสู่การแปรรูปผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น

1.4.3 ได้ระบบการตรวจวิเคราะห์และสูตรอาหารสำหรับซัลโมเนลลา ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนซัลโมเนลลาที่มีประสิทธิภาพ มีระยะเวลาในการรอผลวิเคราะห์สั้น แม่นยำ ทำให้อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องมีความมั่นใจในการส่งสินค้าสู่ผู้บริโภค

1.4.4 สร้างเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ระดับจุลภาคทำให้สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้ปริมาณมากและมีความถี่เพิ่มขึ้น

1.4.5 เพิ่มโอกาสในการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาได้อย่างแม่นยำและถูกต้อง เนื่องจากเป็นการวิจัยบูรณาการภาพรวมปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อดังกล่าว สามารถวิเคราะห์

ตัวอย่างได้มากซ้ำ สร้างความมั่นใจให้กับผลการวิเคราะห์ ลดความผิดพลาดที่เกิดจากการวิเคราะห์ การตีกลับของสินค้าเป็นศูนย์

1.4.6 เทคนิควิธีการตรวจวิเคราะห์ ผู้ประกอบการและลูกค้าให้การยอมรับเทียบเท่าได้กับวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน

1.4.7 โรงงานอุตสาหกรรมทั้งขนาดกลางและขนาดเล็ก สามารถนำนวัตกรรมไปประยุกต์ใช้ได้จริง เพื่อทดแทนเทคโนโลยีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งราคาค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องนำเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อจากต่างประเทศ

1.4.8 ได้วิธีการที่มีการพัฒนาให้ได้มาตรฐาน เป็นยุทธศาสตร์ในการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารในประเทศไทย

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

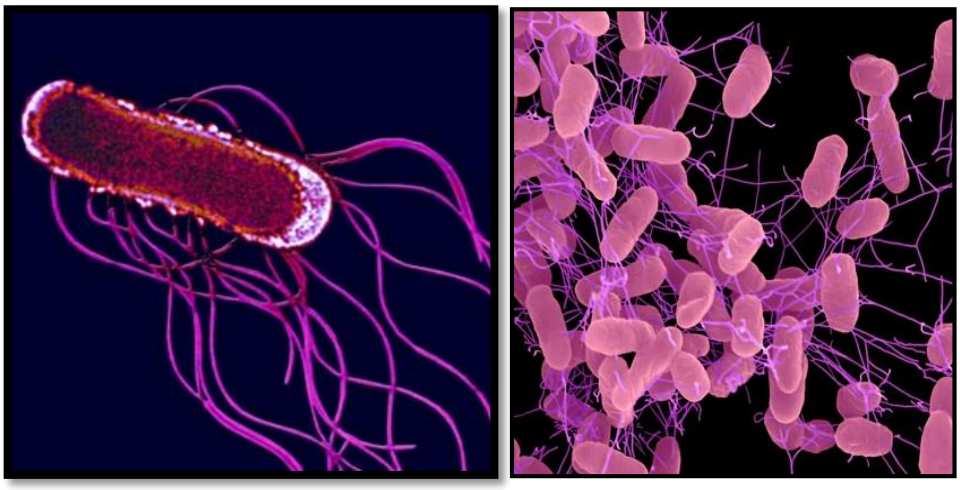
2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา
2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลล่าแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต
2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา
2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน
2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.
2.7 วิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* spp.
2.8 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับซัลโมเนลลา

ในบรรดาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดในคนนั้นซาลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียที่มีการวิวัฒนาขนานไปกับวิวัฒนาของมนุษย์แต่เดิมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสัตว์และก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีเพียงไม่กี่ชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์โดยตรงและอาศัยอยู่ในคนแต่ปัจจุบันนี้ซาลโมเนลล่าจากสัตว์หลายชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและอาศัยเป็นพาหะอยู่ในคนได้เป็นเวลานานทั้งนี้เพราะซาลโมเนลล่าสามารถปรับตัวได้ดีทำให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นเรื่องของเทคโนโลยีใหม่ๆเช่นการผลิตอาหารกระป๋องอาหารแช่แข็งหรือขบวนการต่างๆในการเตรียมอาหารสำเร็จรูปทั้งอาหารที่ยังไม่สุกและอาหารที่สุกแล้วซึ่งในปัจจุบันเกิดขึ้นมากมายเพื่อสนองความต้องการของประชาชนที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยเป็นครัวอาหารโลกจำเป็นอย่างยิ่งต้องควบคุมป้องกันพร้อมทั้งหาทางหยุดยั้งซัลโมเนลลามิให้แพร่กระจายไปในอาหารสิ่งแวดล้อมต่างๆเพิ่มขึ้นดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาจึงเป็นสิ่งที่ทางโรงงานอุตสาหกรรมอาหารไม่สามารถที่จะหลีกเลี่ยงได้

2.1 จุลชีววิทยาของซัลโมเนลลา

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จัดได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ที่พบได้ทุกหนทุกแห่งและทั่วโลก โดยเข้ามามีบทบาทไม่เฉพาะแต่ในคนและสัตว์เลี้ยงของคนเท่านั้นหากยังพบได้ในสัตว์ทั่วๆไปเช่น สัตว์เลื้อยคลานนกและแมลงต่างๆ เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นไม่สร้างสปอร์ รูปที่) 2.1อยู่ในสกุล (Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E.coli*

Salmonella เดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria เป็นจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ พบได้ทั่วไปในแต่ละปีถือว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่เกิดขึ้นกับประชากรต่างๆ ทั่วโลก แม้ว่ามีผู้วิจัยหลายท่านได้กล่าวถึงนิเวศวิทยา สรีระวิทยา ระบาดวิทยา และวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับการแยกและการตรวจพิสูจน์ *Salmonella* ที่ได้มีการตีพิมพ์ไปแล้วจำนวนมาก แต่วิวัฒนาการของ *Salmonella* ทำให้จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัยอยู่เสมอเพื่อนำมาซึ่งความรู้ใหม่ๆ เกี่ยวกับ *Salmonella* และผลเสียหายของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* ที่มีความสัมพันธ์กับอาหาร



(ก) (ข)

รูปที่ 2.1 แฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (ก)
และลักษณะของเชื้อ*Salmonella*เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข)

ประวัติของเชื้อซัลโมเนลล่าเดิมเรียกว่า paratyphoid bacteria ส่วนชื่อสกุลได้เปลี่ยนไปโดยตั้งให้เป็นเกียรติ D.E.Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกันซึ่งได้ร่วมกับ Theobald Smith ที่ได้ทำการแยกเชื้อนี้จากสุกรที่ป่วยโรคอหิวาต์เชื้อที่แยกได้นี้ต่อมาเรียกว่า *Salmonella* Choleraesuis ใน ค.ศ.1885 และในปี ค.ศ.1888 Gartner แยกเชื้อได้จากม้ามผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมันคือ *Salmonella* Enteritidis

ปี ค.ศ. 1892 Loffler แยก *Salmonella* Typhimurium ได้จากหนูขาวที่มีอาการโรคคล้ายไทฟอยด์จนกระทั่ง Schottmiille สามารถแยกถึงความแตกต่างระหว่าง *Salmonella* Paratyphi A และ *Salmonella* Paratyphi B ได้ ในปี 1990 การค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสัตว์ที่ป่วยด้วยโรคต่างๆ มีมากขึ้นทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1926 Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมกันจัดทำหนังสือ Kauffmann – White Schema ขึ้นเพื่อเป็นเอกสารสำคัญแยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* (Ewing, 1986)

ในยุคต้นของศษตวรรษที่ 19 นักพยาธิวิทยาคลินิคในฝรั่งเศส ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเป็นแผลในลำไส้ของมนุษย์กับการเป็นโรคติดต่อเป็นครั้งแรก ซึ่งโรคที่ถูกตรวจพบได้แก่ ไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ต่อมาได้มีการแยกและอธิบายลักษณะของ typhoid bacillus โดยชาวยุโรป พบว่า เชื้อนี้เป็นต้นเหตุของไข้ไทฟอยด์ และต่อมาได้พิสูจน์ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพาราไทฟอยด์ (paratyphoid organisms) (D’ Aoust, 1989; Le Minor,1981) คศ. 1885 D.E. Salmon นักแบคทีเรียชาวอเมริกัน ร่วมกับ Theobald Smit ได้แยก *Bacillus cholera – sius* ในปัจจุบันได้แก่ *Salmonella enteric* ซีโรวาร์ *Choleraesuis* จากสุกรที่ป่วยด้วยโรคอหิวาต์ (Le Minor, 1981) ค.ศ. 1888 Gartner แยกเชื้อ *S.* Enteritidis จากม้ามของผู้ป่วยที่ตายด้วยโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศเยอรมัน ค.ศ. 1892 Loffler แยกเชื้อ Typhimurium ได้จากโรคที่คล้ายไทฟอยด์ในหนูขาว ต่อมาการพัฒนาด้านความรู้เกี่ยวกับเชื้อนี้มีมากจนกระทั่ง Schottmiller สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *S.* Paratyphi A และ *S.* Paratyphi B ได้ในปี ค.ศ. 1900 (อรุณ บ่างตระกูลนนาท์และคณะ, 2540)

การค้นพบ *Salmonella* สายพันธุ์ใหม่มีมากขึ้น ทำให้เกิดความยุ่งยากในการตั้งชื่อสายพันธุ์ใหม่ๆ เหล่านี้ White (1926) เป็นคนแรกที่เสนอ antigenic scheme สำหรับการแบ่งประเภทของ *Salmonella* และต่อมา Kauffmann, Edwards และ Ewing ได้ร่วมมือกับอนุกรรมการจัดทำหนังสือ Kauffmann-White Schema ขึ้นในปี ค.ศ. 1955 เพื่อใช้แยกลักษณะทางแอนติเจนของ *Salmonella* ซึ่งมีการรวบรวม *Salmonella* ไว้มากกว่า 2,400 ซีโรวาร์ (Popoff et al., 2000) การตั้งชื่อ *Salmonella* ได้กำหนดเป็นมาตรฐานตามข้อตกลงระหว่างชาติ โดยเห็นพ้องต้องกันใช้ชื่อนี้ และเริ่มใช้ชื่อนี้ทั่วไปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1955 เป็นต้นมา (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2540)

2.1.1 สัณฐานวิทยา

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7 – 1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0 – 5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anarobe) ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) และบางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟต์ เช่น *S.* Gallinarum อุณหภูมิที่เจริญได้ 37 – 45 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เจริญได้ในช่วงความเป็น กรด – ด่าง 4.5 – 9.0 ความชื้น (A_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญ ประมาณ 0.93 – 0.99 ภายใต้อุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสม *Salmonella* ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที หรือที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที การใช้ความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำไม่สามารถทำลาย *Salmonella* เพียงแต่ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น

2.1.2 การเรียกชื่อ

การเขียนหรือพิมพ์ชื่อซีโรวาร์เปลี่ยนจากการใช้ตัวอักษรเล็กและตัวพิมพ์เอียงเป็นอักษรใหญ่ เช่น *Salmonella typhimurium* เปลี่ยนเป็น *Salmonella* Typhimurium นอกจากนี้ในบางซีโรวาร์ มี Phage เข้าไปแทนที่ทำให้ antigen เปลี่ยนไปซึ่งระบบเดิมจะเปลี่ยนชื่อเป็นซีโรวาร์ใหม่ แต่ละระบบใหม่จะไม่มีการเปลี่ยนชื่อซีโรวาร์ เช่น *Salmonella* ซึ่งมี O antigen 3,10 เมื่อมี phage E15 และ phage E34 เข้าแทรกจะทำให้ factor O:15 หรือ O:15, 34 เข้าแทนที่ factor O:10 ซึ่งเดิม *Salmonella* O:3, 15 จะจัดอยู่ใน group E_2 และ *Salmonella* O:3, 15, 34 จะจัดอยู่ใน group E_3 แต่ในปัจุบันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ O:3, 10 (groupE_1) เท่านั้น แต่ให้เขียน factor O:15 และ O:15, 34 อยู่ในวงเล็บ เช่น

ระบบเดิม S. Anatum3, 10:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_1)

S. Newington3, 15:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_2)

S. Minneapolis3, 15, 34:e, h:1,6 (มี O Antigen group E_3)

ระบบใหม่ จัด *Salmonella* O group E2 และ E3 รวมกับ group O:3, 10(E_1)

โดยให้เขียน factor O:15 และ factor O:15, 34 อยู่ในวงเล็บ

ดังนั้น *S.* Anatum, *S.* Newington และ *S.* Minneapolis จึงมีชื่อเดียวกัน

คือ *S.* Anatum 3,10(15)(15,34):eh:1,6 (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2540)

2.1.3 การจัดแบ่งประเภท

จีนัส *Salmonella* จัดอยู่ใน family Enterobactericeae ภายในจีนัสเดียวกันตามรายงานของ WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur ประเทศฝรั่งเศส รายงานเรื่อง Antigenic formulas of the Salmonella serovars 1987 ได้จัดอนุกรมวิธานของ genus Salmonella และสรุปว่า Salmonella มีเพียง 1 species และแบ่งออกเป็น 7subspecies คือ I, II, IIIa , IIIb, IV, V และ VI มีรายละเอียดดังนี้

Subspecies I	Salmonella enterica subspecies enterica
Subspecies II	Salmonella enterica subspecies salamae
Subspecies IIIa	Salmonella enterica subspecies arizonae
Subspecies IIIb	Salmonella enterica subspecies diarizanae
Subspecies IV	Salmonella enteric subspecies bongori
Subspecies VI	Salmonella enterica subspecies indica

จำนวนซีโรวาร์ ของ *Salmonella* แต่ละ subspecies (1987) มีดังนี้

Subspecies I	จำนวน 1,299	ซีโรวาร์
Subspecies II	จำนวน 445	ซีโรวาร์
Subspecies IIIa	จำนวน 91	ซีโรวาร์
Subspecies IIIb	จำนวน 296	ซีโรวาร์
Subspecies IV	จำนวน 59	ซีโรวาร์
Subspecies V	จำนวน 14	ซีโรวาร์
Subspecies VI	จำนวน 9	ซีโรวาร์
รวม	2,213	ซีโรวาร์

Subspecies I เป็น *Salmonella* ที่พบในคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งพบมากที่สุดจำนวน 1,299 ซีโรวาร์ สำหรับ subspecies II - VI เป็น *Salmonella* มาจากสัตว์เลือดเย็นและสิ่งแวดล้อม ประมาณ 914 ซีโรวาร์ ต่อมา World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella (Institut Pasteur, ประเทศฝรั่งเศส) ได้จัด Taxonomy of genus *Salmonella* ใหม่สรุปว่า *Salmonella* มี 2 สปี

ซีส์ สปีชีส์ที่ 1 ได้แก่ *S. enterica* แบ่งออกเป็น 6 subspecies 2,480 ซีโรวาร์สปีชีส์ที่ 2 ได้แก่ *S. bongori* มี 21 ซีโรวาร์ มีรายละเอียดดังนี้ (Popoff, 2001)

S.enterica subsp. enterica(I)	จำนวน 1,478	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.salamae (II)	จำนวน 498	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.arizonae (IIIa)	จำนวน 94	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.diarizonae (IIIb)	จำนวน 327	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.houtenae (IV)	จำนวน 71	ซีโรวาร์
S.enterica subsp.indica (V)	จำนวน 12	ซีโรวาร์
S. bongori	จำนวน 21	ซีโรวาร์
รวม	2,501	ซีโรวาร์

2.1.4 ลักษณะทางซีรั่มวิทยา

ลักษณะของแอนติเจนที่สำคัญของ *Salmonella* ใช้เป็นคุณสมบัติในการทดสอบทางซีรั่มวิทยา มี 3 ชนิด ดังนี้

1. โอ แอนติเจน หรือ โซมาติก แอนติเจน (O or somatic antigen) เป็นแอนติเจนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซล์ ประกอบด้วยสารประกอบโพลีแซคคาไรด์โปรตีนและฟอสโฟลิปิด มีคุณสมบัติคือสามารถทนความร้อนที่ 100°C นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ทนต่อเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% ทนต่อกรดเจือจาง ปฏิกริยาของโอ แอนติเจนกับแอนติซีรั่มจำเพาะ จะมีลักษณเป็น granular โอ แอนติเจนของ *Salmonella* ถูกจัดแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ตามแบบของ Kauffiman White Schema
2. เอช หรือแฟลกเจลลา แอนติเจน (H or flagella antigen) เป็นส่วนประกอบของสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติ ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนอุณหภูมิ 60°C แอลกอฮอล์และกรด ปฏิกริยาของเอช แอนติเจนกับแอนติซีรั่มที่จำเพาะ จะมีลักษณะเป็น floccular เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากจะมี H แอนติเจน 2 เฟส ได้แก่ เฟส 1 เรียกว่า เฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 เรียกว่า เฟสไม่จำเพาะ (non specific phase) เพราะอาจตรวจไม่พบได้
3. วีโอ แอนติเจน (Vi antigen) เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอกโอ แอนติเจน คุณสมบัติของวีโอ แอนติเจน คือถูกทำลายเมื่อได้รับความร้อน กรด หรือฟีนอล โดยปกติเชื้อ *Salmonella* ที่มีวีโอ

แอนติเจน จะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มีวีโอ แอนติเจน เชื้อ *Salmonella* ที่มีวีโอแอนติเจนได้แก่ *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C และ *S.* Dublin

2.1.5 การทำให้เกิดโรค

Salmonella สามารถก่อให้เกิดโรคได้ดีในผู้ที่มีความต้านทานต่ำ หรือได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายเป็นจำนวนมาก สาเหตุทั่วไปของการติดเชื้อ เกิดจากการับประทานอาหารหรือน้ำที่มีเชื้อปะปนเข้าไป ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการหรือ ไม่มีอาการของโรคปรากฏอาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* จำแนกออกเป็น 3 แบบคือ

2.1.5.1 Enteric fevers ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของ ไข้ไทฟอยด์ ได้แก่ *S.* Typhi เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไข้พาราไปฟอยด์ได้แก่ *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B, *S.* Paratyphi C ไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์จะเกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น สาเหตุที่สำคัญ ในการติดเชื้อคือได้รับเชื้อปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่มเชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ไปตามทางเดินอาหาร ต่อมน้ำเหลือง และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ผู้ป่วยที่มีอาการเฉียบเพลัน สามารถตรวจพบเชื้อได้ในกระแสโลหิต เชื้อสามารถเข้าไปยังอวัยวะต่างๆ ได้รวมทั้งไต ไขกระดูก ลำไส้ ถุงน้ำดี เชื้อถูกขับออกมากับอุจจาระและอาจพบได้ในปัสสาวะ เชื้อทำให้มีอาการอักเสบของ lymphoid tissue ต่างๆ บางครั้งทำให้เยื่อหุ้มกระดูกปอดมีการอักเสบได้ ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 10-14 วัน ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10^6 CFU (Fall, 2000) ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อย ตามตัว เซื่องซึม เบื่ออาหาร มีอาการท้องอืดหรือท้องผูก ม้ามโต ต่อมาอาจมีอาการอุจจาระร่วง อาจมีเลือดปนกับอุจจาระด้วย ถ้ามีการทำลายของเยื่อบุลำไส้เป็นจำนวนมากอาจทำให้เกิดลำไส้ทะลุได้ ระยะของ ไข้ Enteric fevers นานประมาณ 3 – 4 สัปดาห์ โรคพาราไทฟอยด์มีอาการของโรคคล้ายไทฟอยด์แต่จะรุนแรงน้อยกว่า จะก่อให้เกิดอาการ อุจจาระร่วงภายหลังรับประทานอาหารประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

2.1.5.2 Septicemia เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตโดยตรงสามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการของโรคอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีอาการเป็นไข้สูงเป็นระยะๆ ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจทำให้เกิดอาการปวดบวมเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุลิ้นหัวใจอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S.* Choleraesuis

2.1.5.3 Gastroenteritis หรือ Enteritis เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากจะทำให้เกิดอาการแบบนี้โดยเชื้อปนเปื้อนเข้าไปกับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไข่ นมและผลิตภัณฑ์นม หรือสิ่งอื่นๆ ผู้ป่วยเมื่อรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปเชื้อจะแทรกเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อบุลำไส้ใหญ่ และลำไส้เล็กส่วนกลาง ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 6 – 48 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคประมาณ 10^8 CFU (Fall, 2000) ผู้ป่วยจะมีอาการ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง มีไข้เล็กน้อย

2.1.6 ระบาดวิทยา

การปนเปื้อนในอาหารเป็นวิธีการหลักของการส่งผ่าน non – typhoidal *Salmonella* เพราะว่า Salmonellosis เป็นโรคของสัตว์ที่ติดต่อมาถึงคนได้และมีสัตว์ที่เป็นพาหะจำนวนมาก สัตว์ที่เป็นพาหะมากที่สุดได้แก่ ไก่ หมูและวัว นอกจากนี้สัตว์เลี้ยงและสัตว์อื่นๆ ทั่วๆ ไปก็เป็นพาหะของเชื้อนี้ เพราะว่า *Salmonella* สามารถอยู่รอดได้ในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ยังไม่ผ่านความร้อน ผลิตภัณฑ์จากสัตว์จึงเป็นพาหะหลักของการส่งผ่าน *Salmonella* (Giannelia, 2000)

2.2 ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลล่าแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและนิสัยการเจริญเติบโต

ซัลโมเนลล่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้นไม่สร้างสปอร์อยู่ในสกุล Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *E.coli* สมาชิกในสกุลนี้เจริญเติบโตในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobe) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแซ่รอบตัว (peritrichous flagella) และอาศัยอยู่ในลำไส้ของคน

2.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

ซัลโมเนลลาอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น นกสัตว์เลื้อยคลานสัตว์เลี้ยงคนและบางทีก็พบในแมลงแม้ว่าแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์แต่บ่อยครั้งที่พบเชื้อซัลโมเนลล่าตามร่างกายส่วนอื่นๆของสัตว์ด้วย (Jay, 1996) เนื่องจากสัตว์จะปล่อยเชื้อซัลโมเนลล่าผ่านทางอุจจาระซึ่งจะแพร่ผ่านแมลงและสัตว์อื่นๆ ขยายวงกว้างออกไปด้วยเหตุนี้เชื้อซัลโมเนลล่าอาจพบในน้ำโดยเฉพาะในน้ำสกปรกและในอาหารที่มีแมลงวันตอมเมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อนี้เข้าไปบางครั้งจะแสดงอาการป่วยออกมาแต่บางครั้งก็กลายเป็นพาหนะ (carrier) คือไม่แสดงอาการป่วยทั้งๆที่มีเชื้อซัลโมเนลล่าอยู่ในร่างกายมนุษย์ผู้นั้นอาจกลายเป็นพาหะของเชื้อต่อไปมนุษย์และสัตว์ขับเชื้อซัลโมเนลล่าออกจากทางเดินอาหารทางอุจจาระ อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะได้ทำการสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งพบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดร้อยละ 15.38 อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลล่าสูงสุดในฤดูร้อนและต่ำสุดในฤดูฝน (อรุณบ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2545) เชื้อซัลโมเนลล่าในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดินน้ำและสิ่งแวดล้อมปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทางซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่งถ้านำสัตว์ที่มีเชื้อซัลโมเนลล่ามาใช้เป็นอาหารทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรค Salmonellosis ได้ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลลินทรีย์มากน้อยต่างกันตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ๆ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไปเหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่าหากยังไม่สามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเครื่องอุปโภคของคนแล้วการติดเชื้อจาก *Salmonella* จะมีแต่การเพิ่มขึ้นให้เป็นอุสรรคต่อความหวังในการนำสาธารณสุขที่ดีมาให้แก่ประชากรชาวไทย (พนิดาชัยเนตร, 2531)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา

2.4.1 อุณหภูมิ

ซัลโมเนลล่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแม้ว่าจะมีรายงานว่าเชื้อซัลโมเนลล่าในบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (D'Aoust, 1991) ก็ตามสำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 49.5 องศาเซลเซียส (ICMSF, 1996) ด้วยเหตุนี้การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลล่าตามที่ USDA/FSIS แนะนำจึงใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจะสามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลล่าได้แล้วก็ตาม)

2.4.2 pH

ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างกับการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่า พบว่าค่า pH ต่ำสุดที่ซัลโมเนลลาชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่ pH 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อซัลโมเนลล่าส่วนมากเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของซัลโมเนลล่าแต่ละสปีชีส์ด้วย จากการทดลองของชุงและก๊อฟเฟิร์ท (Chung and Goepfert,1970) พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อซัลโมเนลล่ากล่าวคือในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อซัลโมเนลล่าปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้มหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อซัลโมเนลล่าไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

2.4.3 วอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w)

มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่ากล่าวคือเชื้อซัลโมเนลล่าเจริญได้ในช่วงที่มี a_w แคบมากคือค่า a_w ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า a_w สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99 – 1.00 ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่าเช่นมีอาหารเหมาะสมมี a_w เหมาะสมมีอุณหภูมิเหมาะสมเชื้อซัลโมเนลล่าสามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติฉะนั้นปัจจัยร่วม (Combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลล่ามากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

2.5 การปนเปื้อนจากซัลโมเนลลาและการป้องกัน

2.5.1 ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์อันเนื่องมาจากการระบาดของโรค Salmonellosis

การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์อาหารถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อสังคมในเชิงเศรษฐศาสตร์และระบบสุขภาพของมนุษย์ในกรุงเทพมหานคร มีผลงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้า พบว่ามีซัลโมเนลลาจำนวน 30 ตัวอย่างจากทั้งหมด 40 ตัวอย่าง (75%) ฉะนั้นเพื่อความปลอดภัยควรบริโภคแหนมฉายรังสี

การตรวจพบซัลโมเนลลาปนเปื้อนในผักสด ทำให้ต่างประเทศระงับและสั่งห้ามนำเข้าสินค้าผักสดของประเทศไทย ช่วงปลายเดือนกรกฎาคม พ .ศ.2548 ประเทศไทยได้รับแจ้งจากประเทศนอร์เวย์ห้ามนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยเป็นการชั่วคราวจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ สะระแหน่ ต้นหอมผักชีฝรั่ง ผักชี โหระพา ใบจันทร์หอม ผักคะแยง และใบกระเพราเนื่องจากตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาและอีโคไลปนเปื้อน ต่อมาเดือนกันยายน พ .ศ.2548 ประเทศเดนมาร์กได้ตรวจพบจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ในใบกระเพรา โหระพาและผักชีที่นำเข้าจากประเทศไทยและตามมาด้วยประเทศสวีเดนก็ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในผักดังกล่าวเช่นกัน

ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการประเมินถึงผลกระทบค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เกิดจากอาหารเป็นพิษสูงกว่า 35 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี รวมไปถึงการสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน (WHO, 2010) Economic Research Service (ERS) under United States Departmentof Agriculture (USDA) รายงานถึงจำนวนการแพร่ระบาดของโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียเป็นจำนวนเงินถึง 2,646,750,437 ดอลลาร์สหรัฐ (Frenzen, 2009) และในปี 2008 พบการระบาดของโรค salmonellosis ทำให้มีผู้ป่วยกว่า 52,826 รายและเกิดการสูญเสียเป็นมูลค่า 2.6 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ (Anon, 2009) ซึ่งการ

ระบาดของโรค salmonellosis อันเนื่องมาจากเชื้อ *Salmonella*แสดงให้เห็นถึงระบบสุขลักษณะการผลิตและการสุขาภิบาลที่ไม่มีประสิทธิภาพซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella*

2.5.2 การควบคุมและการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Salmonella*

ต้นกำเนิดของโรค salmonellosis เกิดจาการปนเปื้อนของเชื้อ*Salmonella* ในวัตถุดิบจำพวกไข่ ไก่ วัว ที่มีการปนเปื้อนข้ามมายังผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อาหารที่พบว่าสามารถเป็นสาเหตุการเกิดโรค salmonellosis ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี 1973-1978

ชนิดของอาหาร	จำนวนการระบาด (ครั้ง)
เนื้อวัว	77
เนื้อไก่	30
เนื้อไก่งวง	36
เนื้อหมู	25
ไข่	16
ผลิตภัณฑ์นม	50
ปลาและหอย	8
ขนมอบ	12
ผักและผลไม้	9
เครื่องดื่ม	4
อาหารจีน	2
อาหารแมกซิกัน	10
อาหารอื่นๆ	191

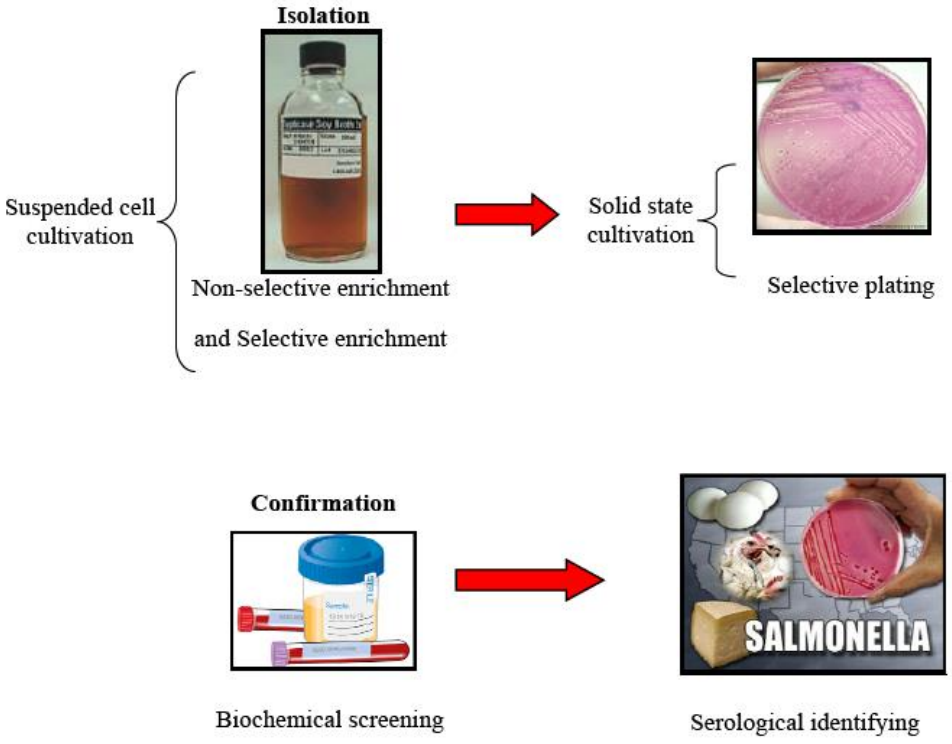
ที่มา: Ray (1996)

การระบาดของโรคนี้เกิดจากการรับประทานอาหารต่างๆ ที่อาจจะได้รับการปนเปื้อนของเชื้อโดยตรงหรือโดยอ้อมจากอุจจาระของสัตว์และมนุษย์ โดยการรับประทานอาหารดิบ หรือปรุงสุกไม่เพียงพอหรือเป็นอาหารที่ได้รับการปนเปื้อนซ้ำภายหลังการปรุงสุกด้วยความร้อน การปนเปื้อนแบบข้ามไปมา การปรุงอาหารภายในบ้านและร้านอาหาร ก็เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดโรคนี้ ในส่วนของการพบเชื้อใน

ผลิตภัณฑ์ประเภทผักซึ่งเชื้อจะปนเปื้อนผ่านทางน้ำที่ไม่สะอาดมาใช้ในการรดผักหรือปุ๋ยต่างๆที่ใส่บำรุงพืชผักให้งอกงามหรือการล้างผักด้วยน้ำสกปรก

2.6 วิธีการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* เริ่มต้นจะทำให้ *Salmonella* แข็งแรงและเพิ่มจำนวน เนื่องจาก *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในอาหารมีการบาดเจ็บหรืออ่อนแอเนื่องจากกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออาจมีปริมาณเชื้อน้อยแต่เป็นเชื้อที่ยังมีชีวิต และมีในปริมาณน้อย เมื่อเชื้อปนเปื้อนในอาหารและเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภคซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จะทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นและก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ การมีเชื้อปนเปื้อนในอาหารน้อย รวมทั้งการใช้อาหารไม่เหมาะสมในการตรวจจะทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ ซึ่งจะทำให้เป็นการรายงานผลที่ผิดพลาดว่าอาหารชนิดนั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภค



รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงกระบวนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Salmonella แบบดั้งเดิม

ที่มา: Andrews and Hammack (1998)

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella*แบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Andrews and Hammack, 1998; McLandsborough, 2005)

1. Pre-enrichment:ขั้นกระตุ้นให้เชื้อที่บาดเจ็บแข็งแรงและเพิ่มจำนวน(24 ชั่วโมง)
2. Selective enrichment: ขั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด(48 ชั่วโมง)
3. Selective plating: ขั้นแยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด (48 ชั่วโมง)
4. Biochemical test: การทดสอบทางชีวเคมี (24 ชั่วโมง)
5. Serological test: การทดสอบทางซีโรวิทยา

ขั้นที่ 1) Pre-enrichment: ขั้นกระตุ้นให้เชื้อบาดเจ็บแข็งแรง

Pre-enrichment เป็นขั้นตอนเริ่มต้น ซึ่งตัวอย่างอาหารถูก enrichment ใน non-selective medium ในการส่งเสริมเซลล์ *Salmonella* ที่ได้รับบาดเจ็บให้กลับสมบูรณ์ดังเดิม อีกทั้งยังเสถียรต่อสภาวะทางกายภาพและยอมให้มีการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* และจุลินทรีย์อื่นๆ Pre – enrichment broth มีหลายชนิดได้แก่ buffer peptone water, nutrient of lactose broths (ICMSF,1978), lactose broth, tryptone soya broth, nutrient broth ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับมาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิง ดังตารางที่ 2.2 ถูกใช้เป็น Pre – enrichment broth สำหรับตัวอย่างอาหารเกือบทั้งหมด ถึงแม้จะมีตัวอย่างอาหารบางชนิดที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะมากกว่า แต่ดูเหมือนว่าเวลาและอุณหภูมิมีความสำคัญมากกว่าการเลือกชนิดของ Pre – enrichment broth ระยะเวลาในการบ่มของ Pre – enrichment ทั่วไปๆคือ 16 – 20 ชั่วโมง (D'Aoust et al., 1992) Pre – enrichment broth ควรที่จะทำให้ Salmonella เจริญได้อย่างน้อย 10^5 CFU/ml เพื่อให้อยู่รอดจากความเป็นพิษของ selective enrichment media (Chen et al., 1993)

ตารางที่ 2.2 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาตรฐานที่ใช้ในการกระตุ้นและคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

Medium	**Commodity**	**Standard Organization**
Bufferd Peptone Water (BPW)	General purpose	ISO, IDF
BPW + Casein	Chocolate	ISO, APHA, AOAC/FDA
Lactose Broth (LB)	Eggs, frog legs	APHA, AOAC/FDA
LB + tergitol 7 or Triton X-100	Coconut, meat	APHA, AOAC/FDA
Skim milk + brilliant green	Cacao, chocolate, candy	AOAC/FDA

Tryptone Soya Broth (TSB)	Spices, dried yeast	AOAC/FDA
TSB + 0.5% potassium sulphate	Onion, garlic powder etc.	AOAC/FDA
Water + brilliant green	Milk powder	AOAC/FDA

ISO = International Organization for Standardization; IDF = International Daily Federation; APHA = American Public Health Association; AOAC = American Association of Analytical Chemists; FDA = Food and Drug Agency

ขั้นที่ 2) Selective enrichment: ขั้นเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เลือกเฉพาะชนิด

จุดมุ่งหมายของ Selective enrichment เป็นการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* และในเวลาเดียวกัน เป็นการลดจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่ Salmonella ใน ISO Standard 6579 ทั้ง Rappaport-Vassiliadis (RV broth) และ Selenite cystine (SC) broth ถูกใช้เป็น enrichment ของ *Salmonella* การเพิ่มปริมาณของ Selenite cystine (SC) broth ไม่มีผลให้เกิดการพบ *Salmonella* เพิ่มขึ้น (O'Donoghue and Winn, 1993) และในทางปฏิบัติเมื่อมีการใช้ enrichment medium เพียงตัวเดียวจะมีการเลือกใช้ RV broth หรือการดัดแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อยู่เป็นประจำ เหตุที่ไม่นิยมเลือกใช้ Selenite cystine (SC) broth เพราะว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงมาก และมีการพัฒนา Selective enrichment broth ขึ้นมาใหม่ชนิดหนึ่งให้ชื่อว่า KIMAN พบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่าและให้ผลดีกว่า SC broth สำหรับการแยกเชื้อ *Salmonella* จากผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก (Blivet et al., 1997) RV medium มีคุณสมบัติเหนือกว่า Selective enrichment media อื่นๆ (Allen et al., 1991; Maijala et al., 1992; June et al., 1996) Fries and Steinhof (1997) พบว่า จำนวนที่น้อยมากของ *S.* Enteritidis ซึ่งมีปนอยู่กับจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีจำนวนมาก สามารถตรวจพบโดย RV enrichment อย่างไรก็ตาม ก็มีรายงานว่าในการตรวจหา *Salmonella* ในเนื้อสัตว์ปีก tetrathionate brilliant green bile broth มีคุณสมบัติสูงกว่า RV broth (De Boer, 1998)

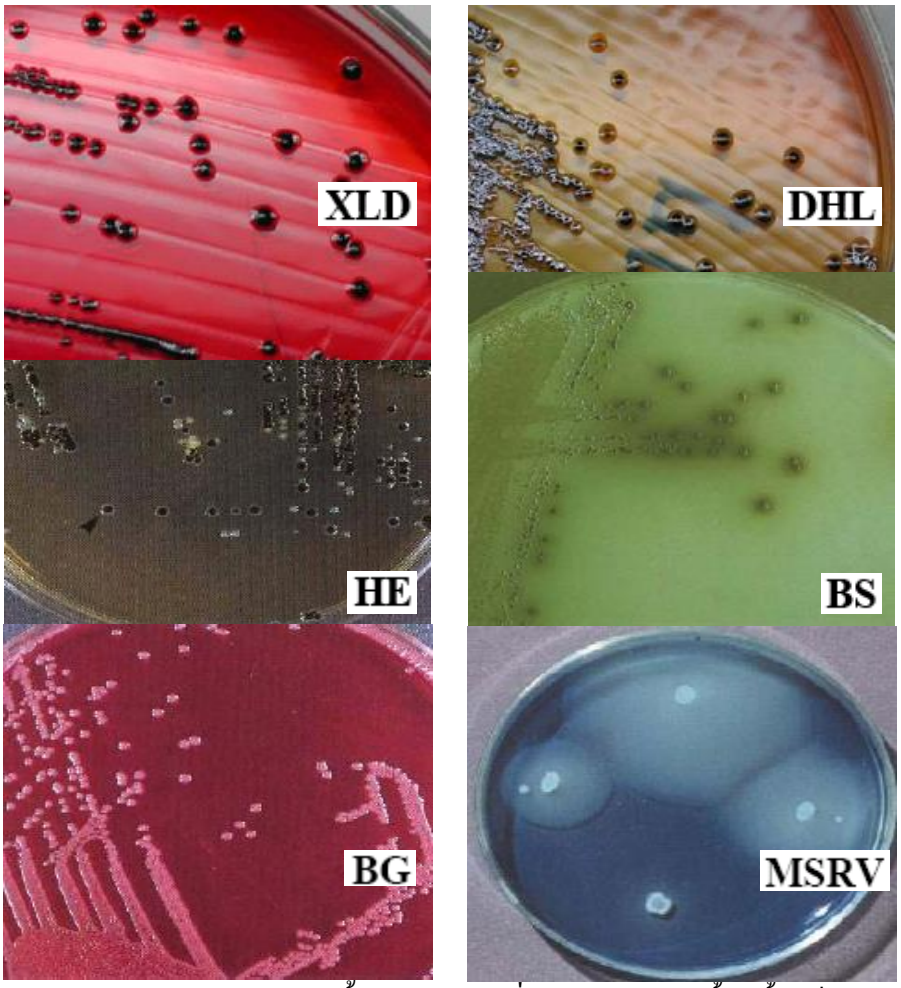
Waltman et al., (1993) แสดงถึงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่ม enrichment cultures คือ 24 ชั่วโมง D'Aoust et al., (1995) พบว่าการระงับการวิเคราะห์ *Salmonella* โดยการแช่เย็นของ pre-enrichment และ enrichment culture ในช่วงวันหยุด ไม่มีผลต่อการลดลงของการพบ *Salmonella* มีการศึกษายืนยันพบว่า motility enrichment บน Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium มีผลมากต่อการแยก *Salmonella* จากตัวอย่างอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น (O'Donoghue et al., 1992; O'Donoghue and Winn, 1993; Pless et al., 1993; Oggel et al., 1995; Bolderdijk and Milas, 1996; Afflu and Gyles, 1997; Schalch and Eisgruber, 1997) การตรวจพบ *Salmonella* โดยใช้ MSRV medium ทำได้ง่าย มีราคาถูกและทั้งผลบวกและผลลบทราบผลภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งง่ายกว่า Standard ISO method ของ buffered peptone water มีผลทำ

ให้การเคลื่อนที่ของ *Salmonella* เพิ่มขึ้นและส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของเส้นผ่านศูนย์กลางบน semi – solid enrichmenr media ปรากฏการณ์นี้เป็นผลในการทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้นลง

หลังจากกระตุ้นให้เชื้อซัลโมเนลล่า (ที่อาจมีในอาหาร) แข็งแรงขึ้นแล้วจึงนำมาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (เลือกเฉพาะเชื้อซัลโมเนลล่า) ตัวอย่างเช่นสี (dyes), tetrathionate, selenite อุณหภูมิระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อจะต้องเหมาะสมกับเชื้อซัลโมเนลล่าซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อซัลโมเนลล่าเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และปรากฏโคโลนีขึ้นเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบน selective differential plating media หรือนำไปจำแนกเชื้อโดยใช้เทคนิคอื่นตามปกติใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อประมาณ 16-24 ชั่วโมงอุณหภูมิที่ใช้บ่มเพาะเชื้อซัลโมเนลล่าโดยทั่วไปอยู่ที่ 35-40°C แต่บ่อยครั้งพบว่าการบ่มเพาะเชื้อที่ 41-43°C มีโอกาสให้ได้เชื้อซัลโมเนลล่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไวต่ออุณหภูมิไม่เจริญรบกวนเชื้อซัลโมเนลล่า ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดที่นิยมใช้ (Selective broth media) เช่น Tetrathionate ที่เติม Brilliant Green, Selenite Cystein, Gram Nagative (GN) broth และ Magnesium Chloride – malachite Green ของ Rappaport – Vassiliadis (Vassiliadis, 1983) ในทางปฏิบัติแนะนำให้ใช้ selective broth media มากกว่าชนิดหนึ่งและอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อมากกว่าหนึ่งสภาวะเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ การรายงานผลจะรายงานว่าตรวจพบ/ไม่พบในปริมาณตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจ

ขั้นที่ 3) Selective plating: ขั้นแยกเชื้อบนวุ้นอาหารเลือกเฉพาะชนิด
อาหารที่ใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ Bile salts, Deoxycholate, Brilliant Green, Bismuth Sulfide และสารปฏิชีวนะ อาหารเหล่านี้จำแนกเชื้อซัลโมเนลล่าโดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนวุ้นอาหารสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ pH indicators ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออันเป็นผลจากความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลแลคโตสหรือซูโครสผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) นอกจากนี้ยังอาจตอบสนองต่อความสามารถของเชื้อที่จะสร้างก๊าซไข่เน่า (H_2S) หรือความสามารถในการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ (decarboxylation) ออกจากกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็นต้นวุ้นอาหาร (Plating media) ที่นิยมใช้ได้แก่ Brilliant Green ที่เติม/หรือไม่เติม sulphadiazine หรือ sulphapyridine, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar, Bismuth Sulfide (BS) Agar, Hektoen Enteric (HE) Agar, MacConkey, Deoxycholate Citrate (DC) Agar และ *Salmonella-Shigella* (SS) Agar ในการใช้วุ้นอาหารที่เลือกเฉพาะชนิดเพื่อแยกเชื้อซัลโมเนลลา แนะนำให้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดเช่นกัน

การ plating บน selective media เป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นและยอมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะเป็น *Salmonella* ซึ่ง selective media มีหลายชนิด bismuth sulfite (Bis), brilliant green (BGA), Xylose lysine deoxycholate (XLD) และ hektoen enteric agar (Hek) นอกจากนี้การประเมินค่าของ plating media และ การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่สำหรับแยก *Salmonella* มีการพัฒนามาตลอด พบว่ายังไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดไหนที่เหมาะสมที่สุด



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella*ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งต่างกัน

ขั้นที่ 4) Biochemical test: การทดสอบทางชีวเคมี

การกลั่นกรองเบื้องต้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่จำกัดชนิดของเชื้อเช่น Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Gilliesmedium I และ II หรือ TSI, Urea Agar เป็นต้น สำหรับการจำแนกเชื้อในขั้นต่อมาอาศัยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งตามปกติจะใช้เวลาหลายวันในการทดสอบขั้นแรก

โดยทั่วไปทำการทดสอบ lysine, urease และ Indole ก่อนจากนั้นจึงทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีอีก 14 อย่างเพื่อจำแนกสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ในระดับ genus (ในทางการค้ามีอุปกรณ์ test kits สำหรับจำแนกเชื้อจำพวก Enterobacteriaceae ในชื่อการค้าต่างๆกัน เช่น Micro ID, Minitek, API20E, Entero-tube II และ Vitek เป็นต้น)

การทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนก *Salmonella* ได้พอสังเขป และถึงแม้ว่าจะแยกได้ *Salmonella* ที่มีลักษณะชีวเคมีใดก็ตาม ก็มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบ agglutimation กับ antisera ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2.3 ปฏิกริยาชีวเคมีของ Salmonella

Test or substrate	**Result**		**Salmonella species reaction**[a]
	Positive	**Negative**	
1. Glucose (TSI)	yellow butt	red butt	+
2. Lysine decarboxylase (LIA)	purple butt	yellow butt	+
3. H_2S (TSI and LIA)	blackening	no blackening	+
4. Urease	purple-red color	no color change	-
5. Lysine decarboxylase broth	purple color	yellow color	+
6. Phenol red ducitol broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	+[b]
7. KCN broth	growth	no growth	-
8. Malonate broth	blue color	no color change	-
9. Indole test	violet color atsurface	yellow color at surface	-
10. Polyvalent flagellar test	agglutination	no agglutination	+
11. Polyvalent somatic test	agglutination	no agglutination	+
12. Phenol red lactose broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	-[c]
13. Phenol red sucrose broth	yellow color and/or gas	no gas; no color change	-
14. Voges – Proskauer test	pink – to – red color	no color change	-
15. Methyl red test	diffuse red color	diffuse yellow color	+

16. Simmons citrate	Growth; blue color	No growth; no color change	v

[a]+, 90% or more positive in 1 or 2 days; -, 90% or more negative in 1 or 2 days; v, variable.

[b]Majority of *S.* Arizona cultures are negative.

[c]Majority of *S.* Arizonae cultures are negative.

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของเชื้อ Salmonella ในขั้นตอนทางชีวเคมี

ขั้นที่ 5) Serological test: การทดสอบทางซีโรวิทยา

แบคทีเรียซึ่งผ่านการทดสอบทางชีวเคมีมาแล้วว่าเป็น Salmonella มีความจำเป็นต้องทำการทดสอบโดยอาศัยปฏิกริยาทางอิมมูนวิทยา เพื่อพิสูจน์ลักษณะแอนติเจนของเชื้อดังกล่าวซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อ *Salmonella* ได้เป็นอย่างดี การทดสอบในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิคทั่วไป นิยมใช้ Slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรั่มที่จำเพาะโดยการหยด antiserum 1 หยดบนสไลด์ จากนั้นถ่ายเชื้อที่สงสัยมาเกลี่ยผสมกับ antiserum ถ้ามีการตกตะกอน แสดงว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* sp.

ตารางที่ 2.4 การทดสอบยืนยันเชื้อ Salmonella

Biochemical reaction	**Auto-agglutination**[1]	**Serological reaction**	**Interpretation**
Typical	No	O-, Vi-, H- antigen positive	Strains considered to be *Salmonella*

Typical	No	All reactions negative	May be *Salmonella*
Typical	Yes	Not tested[2]	
No typical reactions	No/Yes	O-, Vi-, H- antigen positive	
No typical reactions	No/Yes	All reactions negative	Not considered to be *Salmonella*

[1] the agglutination of bacteria after tested with saline solution only

[2] the strain considered as auto-agglutination shall not be submitted to the following tests as the detection of the antigen is impossible.

ที่มา : ISO (2002)

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้วิเคราะห์เชื้อ จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์และจำแนกเชื้อซัลโมเนลล่าแบบดั้งเดิมเป็นวิธีที่ใช้แรงงานและระยะเวลาประมาณ 7 วันเพียงเพื่อที่จะบอกว่ามีแนวโน้มว่าพบเชื้อซัลโมเนลล่าหรือไม่เท่านั้นดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าที่รวดเร็วกว่าเดิมตัวอย่างเช่นวิธี Fluorescent antibody (Cherry et al., 1975; Thomson, 1981; Insalata and Chordash, 1984) วิธี DNA/DNA hybridization assays (DNAH) (Fitts et al., 1983; Ewing, 1986) วิธี Enrichment Serology (Sperber and Diebel, 1969) วิธี Enzyme-linked immunosotbent assay (ELISA) (Minnich et al.,1982; Mattinglyand Gehle, 1984) วิธี Membrane filter – disc – immunoimmobilization (La Roche et al., 1981) และวิธี*Salmonella* phage tests (Welkos et al., 1974) แต่วิธี ELISA และวิธี DNAH (ไม่ว่าจะเตรียมจาก polyclonal หรือ monoclonal antibodies) และวิธี DNAH เป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก AOAC แล้ว (Flowers et al., 1986)

2.7 วิธีรวดเร็วในการตรวจหา *Salmonella* spp.

การตรวจวิเคราะห์ทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารถือว่าเป็นมาตรฐานการปฏิบัติเพื่อให้แน่ใจในคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Conventional ใช้ระยะเวลานานหลายวันกว่าจะทราบผล ดังนั้นวิธีรวดเร็ว (rapid method)

จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตรวจหาทั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ทั้งในวัตถุดิบและในผลิตภัณฑ์อาหาร (De Boer and Beumer, 1999)

วิธีรวดเร็วหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจหา Salmonella จากอาหารที่ได้ถูกนำมาใช้เป็น office methods โดย AOAC International และได้รับการรับรองโดย FDA อย่างไรก็ตามเมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยวิธี Conventional ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธีรวดเร็วนี้สามารถรายงานผลได้เลย วิธีรวดเร็วที่ได้รับการรับรองโดย AOAC International แสดงดังตารางที่ (Andrew et al., 1998)

ตารางที่ 2.5 วิธีรวดเร็วสำหรับการตรวจหา Salmonella ที่ได้รับการรับรองโดย AOAC

Kit name	**Manufacture**	**Primary matrices**	**AOAC Official Methods of Analysis section number**
1-2 TEST	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	989.13
Assurance Gold Salmonella EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.08
Assurance Salmonella EIA	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	992.11
VIP for Salmonella	BioControl Systems, Inc.	Food, ingredeitns and environmental samples	999.09
VIDAS Immuno Concentation Salmonella	bioMerieux	All foods	2001.07;2001.08;2001.09
VIDAS Salmonella (SLM)	bioMerieux	Food and ingredients	996.08
GENE TRAK Salmonella Assay	Neogen Corporation	Food	987.10

Salmonella Tek	Organon Teknika	Food	986.35; 987.11; 993.08
TECRA Salmonella Unique	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	2000.07
TECRA Salmonella VIA	TECRA Diagnostics	Food and food related samples, environmental samples	989.14

ที่มา : www.aoac.org (2004, October)

2.8 การพัฒนาสูตรอาหารเหลวจำเพาะสำหรับซัลโมเนลลา

ในปัจจุบันนี้ มีสูตรอาหารเหลวจำเพาะหลากหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกซัลโมเนลลาที่ดีขึ้นและยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาลง อาหารดังกล่าวยกตัวอย่างแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่มหลัก ตามบทบาทของสารยับยั้ง (inhibitor) ได้แก่ กลุ่มที่หนึ่ง คือ กลุ่มที่มีสารยับยั้งคือ Malachite green และ $MgCl_2$ ตัวอย่างเช่น อาหาร RappaportVassiliadis soy broth (RVS) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มี Selenite เป็นสารยับยั้ง เช่น selenite cystine broth (SC) และ MüllerKauffmann tetrathionate novobiocin broth) MKTTn) (Taskilaet et al., 2012) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะและถูกต้องมากขึ้น แต่ยังคงกลุ่มสารยับยั้งหลักๆ ไว้ในสูตร อย่างไรก็ตามหลังจากบ่มในอาหารดังกล่าวแล้วจะต้องนำตัวอย่างไปเขี่ยบนอาหารแข็งจำเพาะ เพื่ออ่านผลการทดสอบในอีก 1 วันถัดมา ดังนั้นในการพัฒนาอาหารในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดต่างๆโดยอาศัยการวัดการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรียนั้นๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าต่างๆ อาทิเช่น ค่าการนำไฟฟ้า ความขุ่น ค่าสี เป็นต้น (Shelef and Firstenberg-Eden, 1997)

ปฏิกิริยาทางชีวเคมีปฏิริยาหนึ่งที่สำคัญในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งซัลโมเนลลาจัดอยู่ในกลุ่มด้วย ก็คือปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโน โดยปฏิกิริยานี้เกิดจากการเปลี่ยนอะมิโนเป็นเอมีน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสและเอนไซม์ดังกล่าวจะได้รับการกระตุ้นเมื่ออยู่ในสภาวะกรดเมื่อกรดอะมิโนถูกย่อยเป็นเอมีนซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นด่างทำให้อาหารเหลวที่มีอินดิเคเตอร์นั้นเปลี่ยนสี การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม จากการ

วิจัยของ Shelefet et al., (1998) ได้ทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ ไลซีน อาร์จีนีน และออนิทีน ของซัลโมเนลลาและแบคทีเรียอื่นๆในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยอาศัยเครื่อง BioSys สำหรับวัดค่า Transmittance ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร โดยพบว่าสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงค่า Transmittance

ซัลโมเนลลาและแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาการใช้กรดอะมิโนได้ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดกับกรดอะมิโนหลักๆ 3 ชนิด ได้แก่ ไลซีน อาร์จีนีน และออนิทีน ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยกรดอะมิโนได้แตกต่างกันไป ในส่วนของซัลโมเนลลานั้น ทุกสายพันธุ์สามารถมีเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซีเลส ยกเว้น S. Paratyphi A ส่วนออนิทีนดีคาร์บอกซีเลสก็มีในซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ ยกเว้น S. Typhi และนอกจากนี้ ในแบคทีเรียชนิดอื่นบางสายพันธุ์ที่ไม่ใช่ซัลโมเนลลาก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไลซีน และออนิทีนดีคาร์บอกซีเลชั่น ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น แนวทางในการปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความจำเพาะกับซัลโมเนลลามากขึ้นก็คือการนำเอาสารยับยั้งมาช่วยลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในแบคทีเรียชนิดอื่นๆลง

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการนำเสนอการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* เพื่อให้ได้ชุดวิเคราะห์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์และลดเวลาการดำเนินงานจากวิธีการปกติ (conventional method) ซึ่งใช้เวลานาน 3 – 5 วัน ให้เหลือเพียง 2 วัน ทั้งนี้ขั้นตอนที่พัฒนาศึกษาเป็นขั้นตอนการบ่งชี้จำเพาะการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารสีอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (amino decarboxylation) และอาหารสีจากปฏิกริยา H_2S production โดยในอาหารสีอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นเป็นการศึกษาการใช้ตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ได้จากส่วนประกอบพื้นฐานในอาหารมาตรฐานที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบันเพื่อให้ได้สูตรอาหารเหลวจำเพาะที่มีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะก์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ได้อย่างถูกต้อง ในขณะที่อาหารสีจากปฏิกริยา H_2S production มีการพัฒนาสูตรเพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกให้สูงขึ้น นอกจากนี้แล้วอาหารสีอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นมีการนำไปทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์กับตัวอย่างอาหารจริง โดยรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานแสดงดังต่อไปนี้

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Group	Organisms	Culture collection number
Nontyphoid *Salmonella*	*Salmonella* Anatum	DMST 19600
	Salmonella Choleraesuis	DMST 8014
	Salmonella Enteritidis	DMST 15673
	Salmonella Gallinarum	DMST 15968
	Salmonella Rissen	DMST 17365
	Salmonella Typhimurium	TISTR 292
	Salmonella Weltevreden	TISTR 10637
Typhoid *Salmonella*	*Salmonella* Typhi	DMST 22842
Paratyphoid *Salmonella*	*Salmonella* Paratyphi A	DMST 15673
	Salmonella Paratyphi B	DMST 28118
Gram-negative competitors	*Citrobacter freundii*	DMST 16368

	Enterobacter aerogenes	DMST 8216
	Escherichia coli	DMST 4609
	Krebsiella pneumaniae	DMST 8216
	Proteus mirabilis	TISTR 100
	Proteus vulgalis	DMST 557
	Pseudomonas aeruginosa	DMST 4739
	Shigella flexneri	DMST 4423
	Shigella sonnei	DMST 561
	Serratia marcescens	DMST 8845
	Yersinia enterocolitica	DMST 8012
Gram-positive competitors	*Enterococcus faecalis*	DMST 4736
	Listeria innocua	DMST 9011
	Staphylococcus aureus	TISTR 808

3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 0.0001 g (Metter Toledo Model AG204, Switzerland)
- เครื่องชั่ง 0.01 g (Metter Toledo Model GG4002 - S, Switzerland)
- ตู้ปลอดเชื้อ (DWYER Series 0325, USA)
- ตู้เขย่าเชื้อ (New Brunwick Scientific, Enfield, CT)
- ตู้เย็น 4°C (Hitachi 35S I, Japan)
- ตู้บ่ม (Memmert Model ULM500, Japan)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Becthai and Hirayama Model HA300D, Japan)
- Microplate reader (M965, Metertech, Taiwan)
- พีเอชมิเตอร์ (S220 SevenCompact™, Mettler Toledo)
- 96 – well flat bottom microplate (Corning, Tewksbury, MA)
- 96-well U-bottomed polypropylene plate (Nunc, Rochester, NY, USA)
- Multichannel pipette (Biohit, Bohemia, NY, USA)
- Nylon syringe filter membrane (13 mm diameter, 0.45 μm pore size, Filtrex, Thailand)
- Mechanical stepper (Biohit, Bohemia, NY, USA)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB, Lab M, UK)
- Trypticase soy agar (TSA, Lab M, UK)
- Soytone (USbiological, Salem, MA)
- Yeast extract (USbiological, Salem, MA)

3.1.4 กรดอะมิโนชนิดต่างๆ (USbiological, Salem, MA)

- ไลซีน
- ออร์นิธิน

3.1.5 พีเอชอินดิเคเตอร์ต่างๆ

- Phenol red (PR; Acros organics, Fair Lawn, Nj)

3.2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

3.2.1 การทำ frozen stocks

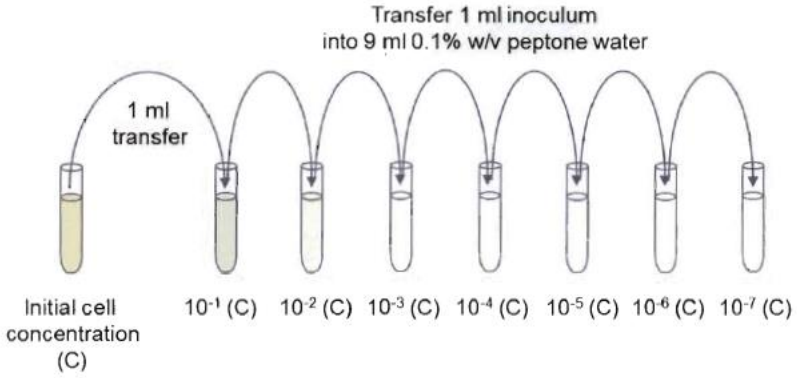
เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Sciences Thailand) ถูก streak ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) เพื่อให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเชื้อเดี่ยวดังกล่าวจะถูกถ่ายลงด้วยลูปในอาหาร tryptic soy broth (TSB) ปริมาณ 100 ml และนำเข้าเครื่องเขย่าที่ 200 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนทำการแช่แข็ง เชื้อ inoculum ถูกผสมอย่างดีกับกลีเซอรอลจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 – 15% (v/v) ปริมาณ 1.5 ml ของส่วนผสมเชื้อและกลีเซอรอลถูกบรรจุลงใน Eppendorf และเก็บรักษาที่ -20°C

3.2.2 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จาก frozen stock ถูกทำให้เพิ่มจำนวนใน 100 ml ของ TSB ในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 ml และทำการบ่มด้วยอุณหภูมิ 37±1°C ภายใต้การเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง นำลูปที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อที่ถูกทำให้เพิ่มจำนวน จากนั้นนำมา streak ลงบนอาหารแข็ง TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ agar ที่มีโคโลนีของเชื้อถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C สำหรับใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง

3.2.3 การเตรียม cell culture preparation

1 ลูปของแต่ละโคโลนีที่อยู่บนอาหาร TSA ถูกนำไปใส่ในอาหาร TSB ปริมาตร 10 ml ที่บรรจุในหลอดทนความร้อนสามารถฆ่าเชื้อได้และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการ ทำการเจือจางเชื้อที่ 10 เท่า ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% w/v ปริมาณเชื้อถูกวัดด้วยเทคนิค spread plate



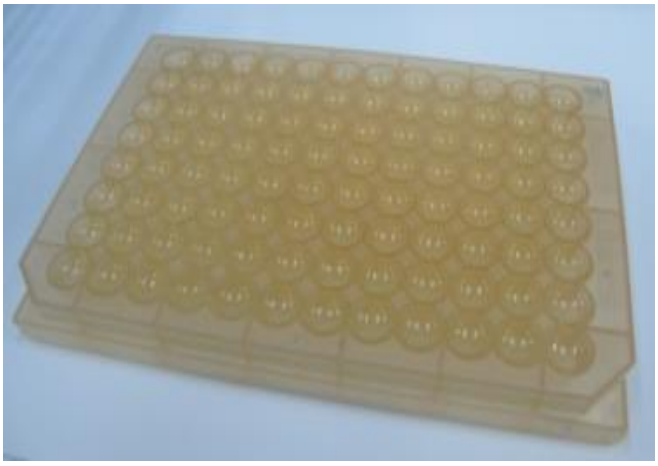
รูปที่ 3.1 Schematic diagram ของการทำเจือจางเชื้อ 10 เท่า

3.2.4 เทคนิคการหาปริมาณเชื้อ

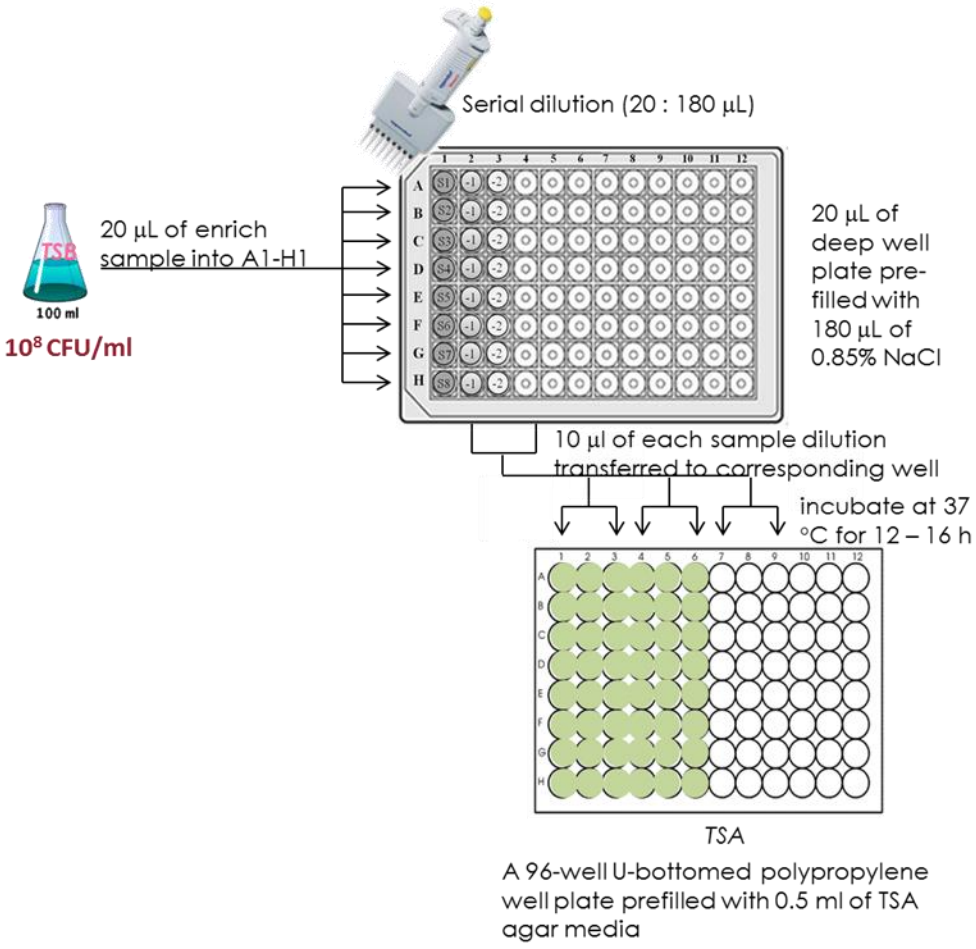
ในการทดลองได้เลือกใช้ *S.* Typhi เป็นเชื้อตัวอย่างที่ใช้ศึกษา โดยเชื้อดังกล่าวถูกนำมาทำให้มีการเจริญเติบโตในอาหาร TSB และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วง 8 – 9 log CFU/ml เซลล์เหล่านี้ถูกนำมานับโดยการใช้เทคนิค spread plate ที่เป็นวิธีการ conventional method เปรียบเทียบกับวิธีการที่นำเสนอซึ่งเป็นแบบ MDPT

สำหรับเทคนิค spread plate เชื้อ *S.* Typhi ที่ปริมาณเชื้อ 8 – 9 log CFU/ml ถูกทำการเจือจางให้อยู่ที่ประมาณ 10^2 – 10^5 CFU/ml ปริมาตรเชื้อที่ 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้นถูก spread โดยตรงบนเพลทอาหาร TSA สำหรับเทคนิค MDPT ที่ปริมาณเชื้อ 8 – 9 log CFU/ml ถูกทำการเจือจาง (10^{-1} – 10^{-5}) โดยปิเปตตัวอย่าง 20 μl ลงใน 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ในแต่ละ well มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จำนวน 180 μl จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างด้วย Multichannel pipette สำหรับการเตรียมเพลทอาหาร TSA โดยใช้แผ่น 96-well U-bottomed polypropylene plate ที่ได้มีการฆ่าเชื้อแล้วถูกเติมด้วยอาหาร TSA ซึ่งในแต่ละ well ของเพลทมีปริมาตรของ TSA ประมาณ 0.5 ml (รูปที่ 3.2) ปริมาตรเชื้อของแต่ละ dilution ที่ 10 μL ถูก

drop ลงบนอาหาร TSA ทั้ง 2 เทคนิคถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนโคโลนีในรูปแบบ log CFU/ml ถูกนับที่เวลาในการบ่มต่างๆ



รูปที่ 3.2 แผ่น polystyrene ที่มีการเติมอาหาร TSA



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการใช้เทคนิค MDPT ในการหาปริมาณเชื้อด้วยอาหาร TSA

3.3 การศึกษาพัฒนาอาหารสีบ่งชี้ที่เหมาะสม

3.3.1 การประเมินอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานสำหรับการเพิ่มจำนวนของ *Salmonella*

ในแต่ละเชื้อ Salmonella ซีโรวาร์ เชื้อปริมาณ 0.2 ml ของ stock culture ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันจาก 6 log CFU/ml ถูกใส่เชื้อลงใน 1.8 ml ของอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐาน 3 ชนิด ดังนี้ Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn), selenite cysteine (SC) และ Rappaport – Vassiliadis soy broth (RVS) การบ่มของตัวอย่างถูกดำเนินการใน 96-deep well ที่แต่ละหลุมมีปริมาตร 2.5 ml (Labcon, Petaluma, CA) การนับปริมาณเชื้อในอาหารเหลวเหล่านี้หลังจากทำการบ่มไป 24 ชั่วโมง ที่ 37±1°C (MKTTn และ SC) และที่อุณหภูมิ 41.5±1 °C (RVS) ถูกนับด้วยอาหาร TSA โดยการใช้ modified drop-plate technique (MDPT) (เขื่อนขันธ์เจริญ และ ทิพยรัตน์, 2011; เลี่ยมแก้ว et al., 2014)

3.3.2 การศึกษาผลกระทบของความขุ่นที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสง

แบคทีเรียเมื่อเจริญเติบโตจะก่อให้เกิดความขุ่นในตัวอย่างที่ทดสอบ เพื่อที่จะให้เกิดความมั่นใจว่าความขุ่นไม่มีผลต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ การศึกษาผลของความขุ่นที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงถูกประเมินตรวจวัดด้วยกระบวนการ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร (A_{550}) ของการเจริญของเชื้อใน 2 อาหารที่แตกต่างกัน ที่เป็น mLDB-PR และที่ไม่มีไลซีนในอาหาร mDB-PR ภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน ตัวอย่างใน mDB-PR เป็นตัวแทนของตัวอย่างควบคุมสำหรับ cell turbidity ที่ไม่มีการเกิดปฏิกริยาของดีคาร์บอกซีเลชั่น ดังนั้นจึงไม่มีการเปลี่ยนสี เชื้อ *S.* Anatum (LDC-positive) ปริมาณ 5 ml ของ 6 log CFU/ml ถูกใส่เชื้อลงใน 45 ml ของแต่ละอาหารด้วยขวด duran ขนาด 200 ml (Schott, Elmsford, NY) และเมื่อนั้นทำการบ่มที่ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างอาหารเหลวที่บ่มปริมาณ 2 ml ถูกย้ายไปยัง microwells ทุก 2 ชั่วโมง จากที่เวลา 0 ถึง 12 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนที่ A_{550} โดยการใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ น้ำกลั่นถูกใช้เป็น blank การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดำเนินการ 3 ซ้ำที่แต่ละเวลาของการบ่มถูกบันทึก ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง A_{550} ระหว่างตัวอย่างที่มีและไม่มีสารซับเสตรทที่ทำให้เกิดปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น เช่น ไลซีน ถูกวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร เนื่องจากปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นที่เกิดได้หักลบค่าการดูดกลืนของความขุ่น การคำนวณในรูปของผลต่างและการไม่คิดในรูปผลต่างของการวัด A_{550} ในแต่ละเวลาถูกเปรียบเทียบโดยการวิเคราะห์ด้วยสถิติ (ANOVA)

ในวิธีที่ 2 ตัวอย่างถูกนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อที่จะให้ได้ค่าความขุ่น และค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ของค่าความขุ่นและตัวอย่างส่วนใส (clear samples) ถูกเปรียบเทียบ เชื้อ *S.* Anatum (LDC-positive) ที่ปริมาณ 5 ml ของ 6 log CFU/ml ถูกใส่เชื้อลงใน 45 ml ของ mLDB-PR ด้วยขวด duran ขนาด 200-ml (Schott, Elmsford, NY) และเมื่อนั้นบ่มที่ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุก 2 ชั่วโมงจาก 0 ถึง 12 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างอาหารเหลว (2 ml) ถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาที โดยการใช้เครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (Himac CR21, Hitachi, Japan) ตัวอย่าง supernatants ที่เคลียร์ใสถูกย้ายไปบรรจุลงใน microwells สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ที่มีการใช้น้ำกลั่นเป็น blank ค่าเฉลี่ยของการทดลองปั่นเหวี่ยงและไม่ปั่นเหวี่ยงจาก 3 ซ้ำการทดลองของตัวอย่างที่แต่ละการบ่มของเวลาถูกเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยสถิติ ANOVA

3.3.3 การเกิดปฏิกริยาอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลชั่นใน *Salmonella* และที่ไม่ใช่ *Salmonella*

เพื่อที่จะทดสอบปฏิกริยาอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลชั่นปริมาณอะมิโนที่ใช้ 5 g/L ของแต่ละซับ สเตรท เช่น L-lysine (L), L-ornithine (O), หรือ L-arginine (A) ถูกเติมด้วยอาหารพื้นฐานที่ประกอบด้วย (ซอยโตน, กลูโคส, และฟีนอลเรด) เพื่อให้ได้อาหารเหลว mLDB-PR, mODB-PR, และ mADB-PR ตามลำดับ อาหารทั้งหมดถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน filtration ด้วย nylon syringe filter membrane (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm., และไส้กรองมีขนาด pore size 0.45 μm) ก่อนใช้งาน เชื้อ Salmonella และ non-Salmonella ปริมาณเซลล์ประมาณ 6-7 log CFU/ml (เตรียมโดยการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนใน TSB และเมื่อนั้นทำการเจืองจางด้วย 0.1% w/v ของเปปโตน) เชื้อปริมาณ 20 μL ถูกเลี้ยงใน 180 μL ด้วย mLDB-PR, mODB-PR, และ mADB-PR ใน sterile 96-deep well microplate ตัวอย่างทั้งหมดถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไมโครเพลทถูกเขย่าที่ความถี่ 14 Hz เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อที่จะให้ตัวอย่างมีการกระจายตัวของเซลล์ในอาหารก่อนที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยการใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ ซึ่งใช้น้ำกลั่นเป็น blank เพราะ mLDB-PR และ mODB-PR ให้ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อนข้างชัดเจนสำหรับการตรวจวัดของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสในเวลาสั้นและทำการเก็บเชื้อ Salmonella ซีโรวาร์ทั้งหมดที่ฟื้นตัวเหล่านี้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4 การศึกษาตัวยับยั้ง (selective inhibitors)

ตัวยับยั้งที่หลากหลายถูกเติมลงใน mLDB-PR และ mODB-PR เพื่อที่จะศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแข่งขันในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ตัวยับยั้งที่ใช้ (ihhibitor) ถูกนำมาจากสูตรมาตรฐานอาหารเหลวจำเพาะที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน 3 ชนิด คือ Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn), selenite cysteine broth (SC) และ Rappaport – Vassiliadis soy broth (RVS) องค์ประกอบของตัวยับยั้งใน MKTTn ถูกประกอบไปด้วย sodium thiosulfate (47.8 g/l), oxgall (4.78 g/l), brilliant green (0.0096 g/l, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 0.8% w/v novobiocin solution (5 ml/l) และสารละลายไอโอดีน (20 ml/l) ตัวยับยั้ง SC ประกอบไปด้วยโซเดียมซีลีไนท์ (4 g/l) และ L-cystine (0.01 g/l) สำหรับตัวยับยั้งของ RVS ประกอบไปด้วย malachite green (0.036 g/L, Acros Organics, Fair Lawn, NJ) และ magnesium chloride anhydrous (28.6 g/l) ตัวยับยั้งในอาหารมาตรฐานแข็งประกอบไปด้วย sodium deoxycholate (2.5 g/L), bile salt (9 g/L, Difco Laboratories, Sparks, MD) และ brilliant green (0.025 g/l) ถูกนำมาแยกในการศึกษา

เดี่ยวๆ โดยเพิ่มเติมของตัวยับยั้งที่ใช้ selective agents ในอาหาร new selective medium, KIMAN ประกอบไปด้วย potassium iodide (40 g/L), malachite green (10 mg/l) และ novobiocin (20 mg/l) ถูกนำมาศึกษาความเข้มข้นของแต่ละสารตัวยับยั้งถูก varied ในอาหารเหลวจำเพาะ mLDB-PR ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง tetrathionate (โซเดียมไธโอซัลเฟต 47.8 g/l และสารละลายไอโอดีน 20 ml/l) เป็น 0.25x, 0.5x และ 1x; brilliant green 30, 40, 50 mg/l; sodium selenite 1, 2, 3, 4 g/l; malachite green 40, 60, 80, 100 mg/l; magnesium chloride anhydrous 30, 40, 50, 60 g/l; potassium iodide 40, 50, 60, 70 g/l; novobiocin 120, 140, 160 mg/l สำหรับ mODB-PR ความเข้มข้นของตัวยับยั้งของ tetrathionate 0.25x, 0.5x, 1x; brilliant green 5, 10, 15 mg/l; sodium selenite 2, 3, 4, 5 g/l; malachite green 60, 80, 100 mg/l; magnesium chloride anhydrous 40, 50, 60, 70 g/l; potassium iodide 40, 50, 60, 70 g/l; novobiocin 20, 40, 60, 80 mg/l ตัวอย่างอาหารเหลวที่ทดสอบทั้งหมดหลังจากผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จะถูกปรับให้ได้ pH ที่ 7.0±0.2 (red-orange color) โดยการใช้กรดความเข้มข้น 1 N และ NaOH ความเข้มข้น 1 N แล้วหลังจากนั้นตัวอย่างถูกทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน sterile nylon syringe filter membrane ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm., และไส้กรองมีขนาด pore size 0.45 μm ก่อนการใช้งาน ในแต่ละ well ของ 96 microwell plate ถูกเติมด้วย 180 μl ของอาหารเหลวที่แตกต่างกัน ที่ได้ถูกอธิบายไว้ก่อนหน้านี้และแต่ละการใส่เชื้อของ *Salmonella* และที่ไม่ใช่ *Salmonella* ปริมาณ 20 μl ของ 6 – 7 log CFU/ml จะถูกใส่ลงในไมโครเพลทและนำไปบ่มภายใต้เงื่อนไขที่อุณหภูมิคงที่ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลของสารตัวยับยั้งที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียถูกศึกษาโดยการใช้ microplate reader และใช้น้ำกลั่นเป็น blank ผลการทดลองที่เป็น positive และ negative จากปฏิกริยา decarboxylase ถูกได้รับจากการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่สอดคล้องกับอาหารเหลวที่ไม่ได้มีการเติมเชื้อ (control) Positive (+) เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 550 นาโนเมตรที่ให้ค่า absorbance มากกว่าตัวอย่างที่เป็น control, สำหรับตัวอย่างที่เป็น negative (-) การวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 550 นาโนเมตรน้อยกว่าหรือเท่ากับค่า absorbance ของตัวอย่าง control

3.3.5 การศึกษา detection limit ของอาหารเหลวจำเพาะ Modified Decarboxylase Broths

ในแต่ละ *Salmonella* ซีโรวาร์ suspension ตามตารางที่ 3.1 ปริมาณเซลล์ 20 μL ของเชื้อ 1-8 log CFU/ml ถูกบ่มใน 180 μl ของแต่ละอาหารเหลวบ่งชี้เบื้องต้น 7 AADC broths ที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.3.4, mLDB-PR, mODB-PR, LRVS, ORVS, LMC, และ ONB ใน 96-well microplate การใส่เชื้อลงในอาหาร

เหลวจำเพาะ AADC ถูกประเมินประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงด้วย (A_{550}) ในระหว่างการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37±1°C และรายงานผลเป็น positive/negative สำหรับปฏิกริยาเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส

3.4 การพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะของปฏิกริยาการเกิด H_2S production

3.4.1 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรียบริสุทธิ์และการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้รับมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST, Bangkok, Thailand) และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR, Bangkok, Thailand) โดยเชื้อเป้าหมาย *Salmonella* ที่เป็น 5 non-typhoid ซีโรวาร์ (*Salmonella* Anatum, DMST 19600; DMST 19600; *Salmonella* Enteritidis, DMST 15673; *Salmonella* Rissen, DMST 17365; *Salmonella* Typhimurium, TISTR 292; and *Salmonella* Weltevreden, DMST 10637) และที่เป็น 2 typhoid และ paratyphoid serovars (*Salmonella* Typhi, DMST 22842; และ *Salmonella* Paratyphi B, DMST 28118) เชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบและเป็นเชื้อแข่งขันรวมถึง *Citrobacter freundii*, DMST 16368; *Enterobacter aerogenes* DMST 8216; *Proteus mirabilis,* TISTR 100; *Proteus vulgaris,* DMST 557; *Psuedomonas aeruginosa,* DMST 4739; *Shigella flexneri,* DMST 4423; *Shigella sonnei,* DMST 561; *Serratia marcescens,* DMST 8845; and *Yersinia enterocolitica,* DMST 8012. เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นเชื้อแข่งขัน เช่น *Enterococcus faecalis*, DMST4736; *Listeria innocua*, DMST 9011; และ *Staphylococcus aureus,* TISTR 808 ได้ถูกนำมาทดสอบด้วยเช่นกัน โดยเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิดถูกนำมา sub-culture ลงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA, Lab M, UK) และใช้ลูปเขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหารเหลว 10 ml ของ tryptic soy broth (TSB, Lab M, UK) ที่บรรจุในหลอดแก้วขนาด 10 ml และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ dilution ตัวอย่างที่ 10 เท่า ใน peptone ความเข้มข้น 0.1% w/v (PW, Difco Laboratoroes, Sparks, MD) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

3.4.2 การเตรียม Media

พฤติกรรมของเชื้อจุลินทรีย์จะถูกศึกษาในอาหารเหลวที่ (pH 7.0±0.1) โดยอาหารที่ใช้ศึกษามีดังต่อไปนี้ (1) อาหาร TFX ที่ถูกพัฒนาจาก Xylose Lysine Decarboxylase agar (XLD) ที่มีส่วนประกอบของซอยโตน ปริมาณ (USbiological, Salem, MA), 4.5 g/L; ไซโลส (Acros organics, Fair Lawn, NJ), 1 g/L; เฟอริก แอมโมเนียมซิเตรท (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), 0.5 g/L ; โซเดียมไธโอซัลเฟต, 0.1 g/L อาหารเหลว TFX ถูกนำมาเติม 5 กรัมของ L-lysine, L-ornithine, และ L-arginine (USbiological, Salem, MA) เพื่อที่พัฒนาไปเป็น (2) TFXL, (3) TFXO, และ (4) TFXA, ตามลำดับ โดยอาหารทั้งหมดถูกผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยความร้อนและทำให้เย็นจนถึงที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนที่จะมีการปรับ pH ให้เป็น pH เริ่มต้นประมาณ 7.0±0.1 ด้วยกรด HCl (QRëC®, Malaysia) ความเข้มข้น 1 N และ NaOH (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 1 N และเมื่อนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิคการกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm ที่เป็นไนล่อนมี pore size ขนาด 0.45 μm (Filtrex, Thailand) ก่อนการใช้

3.4.3 ผลของกรดอะมิโนเดี่ยวในอาหาร TFX ของการเกิด hydrogen sulfide production

เพื่อที่จะศึกษาผลของกรดอะมิโนในการเพิ่มความเข้มของปฏิกริยาในการเกิดตะกอนสีดำในแต่ละ 96-micowell plates ถูกเติมด้วย 180 μL ของ TFXL, TFXO, และ TFXA เมื่อนั้นเชื้อ Salmonella ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเชื้อที่ไม่ได้เป็น Salmonella จำนวน 20 μL แต่ละเชื้อถูกเติมลงใน media ที่ใช้ในการทดสอบไมโครเพลทถูกทำการบ่มภายใต้อุณหภูมินิ่งที่ 35±2 ºC เป็นเวลา 48 h โดยทำการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรด้วย wavelength ที่เหมาะสมซึ่ง wavelength ดังกล่าวได้ถูกมีการศึกษาก่อนหน้านี้โดยเขื่อนขันธ์เจริญและคณะ, 2016 ซึ่งตัวอย่างมีการวัดระหว่างทำการบ่ม media และใช้ blank ที่ไม่มีการเติมเชื้ออาหารเหลวที่เป็น control จะไม่มีการเติมกรดอะมิโนโดยจะอยู่ในรูป TFX

3.4.4 ผลของคาร์บอนที่มีต่อการเกิด hydrogen sulfide production ในอาหาร TFLOA

อาหารเหลว TFLOA ถูกเตรียมด้วยการผสม 5 g/L ของแต่ละกรดอะมิโนที่เป็น L-lysine, L-ornithine, และ L-arginine กับส่วนประกอบอื่นๆ เช่น ซอยโตน 4.5 g/L, โซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 g/L, และเฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท 0.5 g/L การทดลองเดียวกันถูกดำเนินการที่ TFLOA ด้วยน้ำตาลต่างชนิดกันจำนวน 19

ชนิด ปริมาณน้ำตาลที่ใช้แต่ละชนิดเป็น 1 g/L สำหรับอาหารที่ควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมคาร์โบไฮเดรต, TFLOA

3.5 การทดสอบกับตัวอย่างอาหาร

อาหารหลากหลายชนิดที่ขุ่น (milk, cooked chicken meat, chilled ready-to-eat stir-fried basil chicken with rice, และ chilled ready – to – eat boiled eggs) ถูกใช้ในการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของการวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับ DC-positive แบคทีเรีย ตัวอย่างอาหารทั้งหมดถูกซื้อมาจากร้านสะดวกซื้อและวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ตามมาตรฐาน ISO 6579:2002 เพื่อให้ได้ผลที่เป็น reference ตัวอย่างอาหาร 25 กรัมที่มีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ในตัวอย่างอาหาร boiled eggs, cooked chicken meat, และ stir-fried basil chicken with rice) ถูก spiked ด้วย 1 ml ของ *S.* Typhimurium ที่ 1 log CFU/ml ตัวอย่าง 25 ml ที่ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (นมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ถูก spiked ด้วยแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

(a) 1 ml ของ *S.* Typhimurium ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/ml
(b) 1 ml ของ S. Typhimurium ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/ml และ 1 ml ของ *E. coli* ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/ml (LDC และ ODC เชื้อที่สามารถเกิดปฏิกริยา)
(c) 1 ml ของ *E. coli* ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/ml
(d) 1 ml ของ *P. vulgalis* ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/ml (LDC และ ODC เชื้อที่ไม่สามารถเกิดปฏิกริยาได้)

อาหารเหลวไม่จำเพาะที่เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง universal pre-enrichment broth (UPB) ปริมาณ 225 ml ถูกเติมด้วยตัวอย่างปริมาณ 25 กรัมแล้วจึง homogenized ด้วย stomacher (Interscience, 400 VM, Saint Nom, France) เป็นเวลา 10 วินาทีที่ high speed ตัวอย่างที่ homogenized แล้วถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ pre-enriched แล้วถูกปรับให้เป็นกลาง (pH 7.0±0.2) และตัวอย่างอาหารปริมาณ 20 µl ถูกนำมาใส่ในอาหารที่พัฒนาปริมาณ 180 µl ของแต่ละอาหารเหลว AADC (mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, และ ONB) ที่อยู่ใน sterile 96-deep well microplate ตัวอย่างทั้งหมดถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37±1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะทำการวัดด้วยไมโครเพลทโดยก่อนวัดตัวอย่างจะถูกเขย่าที่ความถี่ 14 Hz เป็นเวลา 5 วินาที เพื่อที่จะ disperse เซลล์ในตัวอย่างก่อนทำการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร และใช้น้ำกลั่นเป็น blank ทุกการทดลองถูกดำเนินการ 3 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ *Salmonella* สำหรับขั้นตอนการเลี้ยงในอาหารเหลวจำเพาะ (Selective enrichment) ที่เป็นการประยุกต์ใช้อาหารเหลวที่ได้มีการพัฒนาจากการใช้กรดอะมิโน (amino decarboxylation) และการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ในขณะเดียวกันมีการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถใช้ปฏิกริยาดังกล่าวได้ โดยปฏิกริยาทั้ง 2 สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry) ด้วยการเพาะเชื้อระดับเล็ก (micro-scale) โดยการใช้อุปกรณ์ 96-microplate ทั้งนี้อาหารเหลวจำเพาะการใช้กรดอะมิโนได้มีการศึกษาชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียแข่งขันของซัลโมเนลลาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เหมาะสม ที่สามารถจำแนกซัลโมเนลลาและแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆได้ โดยอาศัยการตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงจากการเปลี่ยนสีของอาหารและพัฒนาสูตรอาหารการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ด้วยการแทนที่ด้วยน้ำตาลที่สามารถเกิดปฏิกริยา fermentation ได้ นอกจากนี้อาหารเหลวจำเพาะของกรดอะมิโนได้มีการทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการตรวจ detection ด้วยการนำไปทดสอบกับตัวอย่างจริง ดังแสดงผลต่อไปนี้

4.1 การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

ในอดีตที่ผ่านมา สูตรอาหารเหลวจำเพาะที่หลากหลายชนิดได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อเพิ่มความไวและความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ โดยการลดความเป็นพิษของอาหารและเพิ่มส่วนประกอบอื่นๆ เพื่อการเจริญเติบโต (Muller, 1923; Kauffmann, 1930; Kauffmann, 1935; Leifson, 1939; Rappaport et al., 1956; van Schothorst และ Renaud, 1983; van Schothost และ Renaud, 1985) อย่างไรก็ตามอาหารเหล่านี้ไม่สามารถบ่งชี้ว่ามีการปรากฏของเชื้อ *Salmonella* และยังต้องการขั้นตอนการนำไปลงในเพลทอาหารแข็งอีก ทั้งนี้ยังไม่มีอาหารมาตรฐานใดที่สามารถฟื้นฟูเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ด้วยความไวที่สูงได้ (Taskila et al., 2012) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีการพัฒนาอาหารเหลวจำเพาะใหม่ที่เป็นการใช้กรดอะมิโนและปฏิกริยาการใช้

ไฮโดรเจนซัลไฟด์ด้วยชนิดของตัวยับยั้งที่เหมาะสม ดังนั้นกิจกรรมของการเกิดปฏิกริยาสามารถตรวจสอบความถูกต้องและรวดเร็วด้วยการวัดด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์

เพื่อที่จะแสดงให้เห็นผลของสารตัวยับยั้งที่เป็นส่วนประกอบในอาหารมาตรฐานเหลวจำเพาะ (standard selective broth) และจำเป็นสำหรับการพัฒนาอาหารเหลวสี การ resuscitation ของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวเหล่านี้ถูกประเมิน อาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานในการเพิ่มจำนวนสำหรับเชื้อ *Salmonella* ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มสอดคล้องกับตัวยับยั้งที่สำคัญๆ เช่น เตราไทโอเนต ซีลีไนท์ และมาลาไคกรีนร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์ สำหรับมาตรฐาน ISO ได้แนะนำให้ใช้อาหาร MKTTn ร่วมกับ RVS ในการเพิ่มความสามารถในการฟื้นฟูของเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ สำหรับมาตรฐานบางอันเช่น Bacteriological Analytical Mannual (BAM) อาหารเหลวจำเพาะ 2 อาหาร พัฒนาจาก 3 สูตร TT, SC และ RV ขึ้นอยู่กับตัวอย่างอาหาร ในงานวิจัยนี้ พวกเราเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะในการเพิ่มจำนวนที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน 3 ชนิด (standard selective broths) MKTTn, SC, และ RVS บนพื้นฐานความสามารถของการฟื้นตัวในสภาพที่มีตัวยับยั้ง (typical) และ sensitive (atypical) Salmonella ซีโรวาร์ (Blivet et al., 1997) ปริมาณเซลล์จาก 1 ถึง 6 log CFU/ml โดยแต่ละ *Salmonella* ซีโรวาร์ ปริมาณเชื้อจำนวน 0.2 ml ของปริมาณเซลล์ที่ 1 ถึง 6 log CFU/ml ถูกถ่ายเชื้อลงใน 1.8 ml ของแต่ละอาหารเหลวมาตรฐานจำเพาะทั้ง 3 ชนิด คือ MKTTn, SC และ RVS ใน 2.5 ml 96-deep well plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ของอาหารเหล่านี้ถูกนับหลังจาก enrichment เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิการบ่ม 37±1°C (MKTTn และ SC) และ 41.5±1°C (RVS) ถูกนับเชื้อด้วยเทคนิค spread-plate บนอาหาร TSA

ท่ามกลางอาหารเหลวจำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า RVS ให้ประสิทธิภาพความสามารถในการฟื้นฟูเชื้อ *Salmonella* ทั้ง typical และ atypical (1 - 2 log CFU/ml) การศึกษาที่หลากหลาย (Maijala et al., 1992; June et al., 1995; Blivet et al., 1997; Schonenbrucher et al., 2008) โดย SC ให้ความสามารถในการ resuscitation ที่เหมือนกับใน RVS ยกเว้น *S.* Choleraesuis และ *S.* Typhi ซึ่งสามารถมีชีวิตที่ 6 และ 4 log CFU/ml ตามลำดับ สำหรับ MKTTn, ที่ 1-2 log CFU/ml ของเชื้อ *S.* Enteritidis, *S.* Rissen, *S.* Weltevreden, และ *S.* Paratyphi B ถูก detected ในขณะที่เชื้อไม่สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ถ้าปริมาณเซลล์เป็นที่ 4 – 6 log CFU/ml MKTTn ไม่สามารถที่จะฟื้นฟูเชื้อ *S.* Choleraesuis ที่ 6 log CFU/ml ดังนั้นไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S.* Choleraesuis.

ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นข้อจำกัดของอาหารเหลวบางชนิดที่ต้องการปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่สูง (เซลล์ที่ active ปริมาณ 4 ถึง 6 log CFU/ml) เพื่อที่จะ detection ของเชื้อ *Salmonella* (Chen et al., 1993) เมื่อการทดสอบตัวอย่างอาหารจริงด้วยเซลล์ที่บาดเจ็บ หลายๆ รายงานแสดงให้เห็นว่าเกิดความล้มเหลวกับอาหารเหลวมาตรฐานเพิ่มจำนวนที่มีการใช้ในปัจจุบันสำหรับการ detection ของ *Salmonella* (Cudjoe et al., 1994; June et al., 1995; Schonenbrucher et al., 2008) การใช้ตัวยับยั้งที่มากเกินไปในช่วงแรกของการเกิดจะส่งผลให้เกิด false negative ได้ ดังนั้นมันจึงมีความจำเป็นที่จะต้อง optimize ปริมาณของตัวยับยั้งที่เหมาะสมสำหรับใช้กับระบบอาหารเหลวเพื่อความถูกต้องและมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella*

ตารางที่ 4.1 การ recovery ของเชื้อ typical และ atypical ของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวมาตรฐาน 3 ชนิด: MKTTn, Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth; SC, selenite cysteine broth; RVS, Rappaport – Vassiliadis soy broth จำนวนในคอลัมน์เป็นค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ± SEM, N = 3 หลังจาก 24 ชั่วโมงใน selective broth

Salmonella	***Salmonella***	**อาหารเหลว**	**ความเข้มข้นของเซลล์ (log CFU/ml)**					
group types	**serovars**		1	2	3	4	5	6
Typical serovars	*S.* Anatum	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.15±0.21	5.89±0.16
		SC	7.28±0.14	7.58±0.37	7.60±0.17	7.24±0.34	7.77±0.19	7.89±0.27
		RVS	7.21±0.13	7.84±0.34	7.83±0.24	7.80±0.06	7.78±0.25	7.76±0.08
	S. Choleraesuis	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
		SC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.35±0.49
		RVS	0.00±0.00	3.32±0.03	3.55±0.35	3.68±0.29	5.83±0.19	7.00±0.43
	S. Enteritidis	MKTTn	0.00±0.00	2.00±0.00	2.15±0.21	2.24±0.34	2.66±0.26	2.78±0.25
		SC	5.79±0.23	6.80±0.29	7.58±0.03	7.16±0.23	7.27±0.38	7.71±0.10
		RVS	2.39±0.12	2.54±0.09	2.65±0.07	2.57±0.38	7.22±0.11	7.24±0.03
	S. Rissen	MKTTn	0.00±0.00	2.74±0.37	4.84±0.43	5.15±0.21	6.15±0.18	7.42±0.26
		SC	7.01±0.04	7.42±0.16	7.64±0.08	7.53±0.08	7.90±0.13	7.73±0.49
		RVS	7.62±0.48	7.55±0.10	7.57±0.18	7.50±0.28	7.58±0.14	8.02±0.02
	S. Typhimurium	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.81±0.15
		SC	2.95±0.07	4.81±0.05	5.94±0.14	7.55±0.10	7.79±0.16	7.81±0.29

ตารางที่ 4.1 การ recovery ของเชื้อ typical และ atypical ของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวมาตรฐาน 3 ชนิด: MKTTn, Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth; SC, selenite cysteine broth; RVS, Rappaport – Vassiliadis soy broth จำนวนในคอลัมน์เป็นค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ± SEM, N = 3 หลังจาก 24 ชั่วโมงใน selective broth (ต่อ)

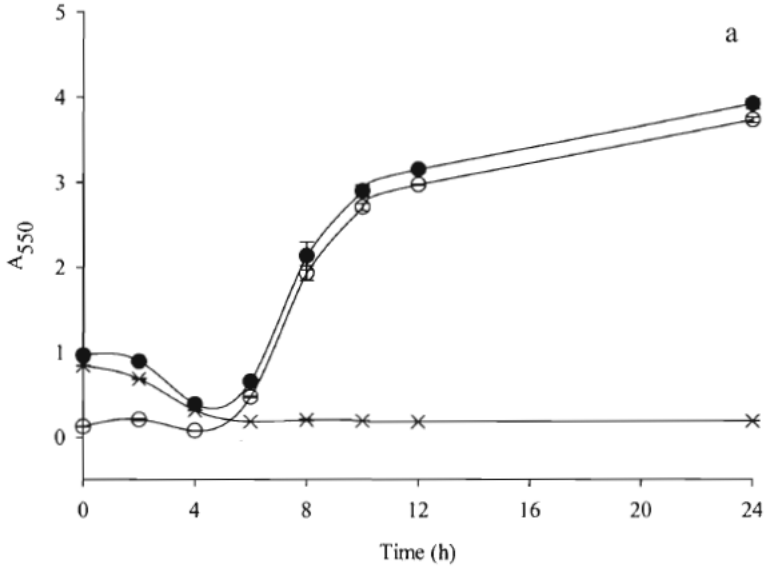
Salmonella	***Salmonella***	**Broths**	**ความเข้มข้นของเซลล์ (log CFU/ml)**					
group types	**serovars**		1	2	3	4	5	6
		RVS	7.34±0.19	7.71±0.10	7.46±0.20	7.44±0.37	7.67±0.09	7.91±0.19
	S. Weltevreden	MKTTn	3.38±0.11	5.24±0.09	6.02±0.30	7.68±0.24	7.71±0.19	7.76±0.20
		SC	0.00±0.00	7.70±0.13	7.68±0.29	7.65±0.24	7.72±0.17	7.87±0.04
		RVS	7.40±0.11	7.42±0.08	7.45±0.03	7.47±0.27	7.52±0.37	7.85±0.21
	S. Paratyphi B	MKTTn	4.38±0.11	4.52±0.37	4.56±0.12	4.60±0.18	5.17±0.24	5.80±0.02
		SC	7.40±0.56	7.46±0.23	7.55±0.35	7.58±0.39	7.93±0.04	7.95±0.07
		RVS	6.66±0.26	7.07±0.26	7.15±0.05	7.37±0.16	7.48±0.31	7.55±0.21
	S. Gallinarum	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.24±0.34
		SC	0.00±0.00	2.24±0.34	2.78±0.25	2.85±0.21	2.89±0.16	3.80±0.21
		RVS	0.00±0.00	2.59±0.16	3.49±0.02	3.55±0.07	4.30±0.43	6.40±0.28
	S. Typhi	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.24±0.34	3.34±0.48	3.54±0.34
Atypical		SC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.15±0.21	3.28±0.28	4.54±0.10
serovars		RVS	0.00±0.00	2.89±0.16	3.91±0.19	4.87±0.13	5.63±0.21	7.41±0.15
	S. Paratyphi A	MKTTn	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.50±0.71	2.65±0.49

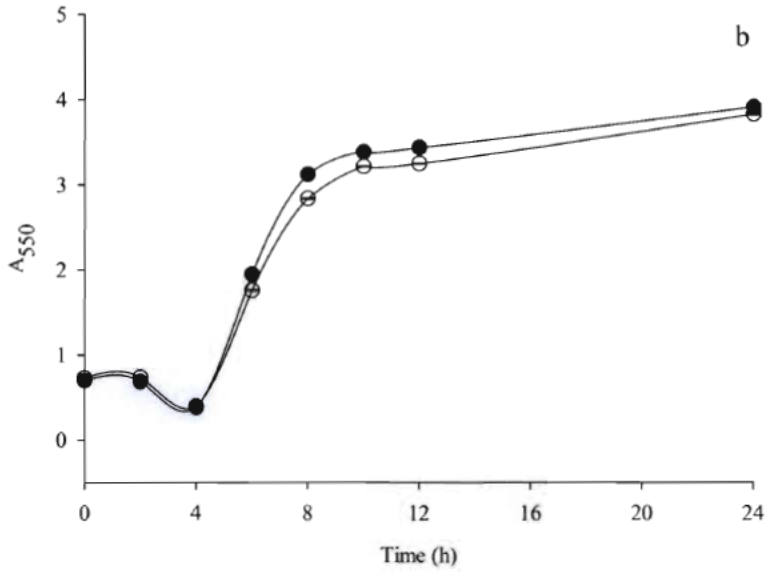
ตารางที่ 4.1 การ recovery ของเชื้อ typical และ atypical ของเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวมาตรฐาน 3 ชนิด: MKTTn, Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth; SC, selenite cysteine broth; RVS, Rappaport – Vassiliadis soy broth. จำนวนในคอลัมน์เป็นค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ± SEM, N = 3 หลังจาก 24 ชั่วโมงใน selective broth (ต่อ)

Salmonella	***Salmonella***	**Broths**	**ความเข้มข้นของเซลล์ (log CFU/ml)**					
group types	**serovars**		1	2	3	4	5	6
		SC	0.00±0.00	4.74±0.20	6.54±0.33	6.80±0.07	7.46±0.54	7.58±0.17
		RVS	3.19±0.16	4.92±0.11	7.05±0.29	7.07±0.24	7.09±0.20	7.48±0.25

4.2 ผลของความขุ่นของเซลล์ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้โดยการใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

ในระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Salmonella* spp. การเจริญเติบโตของเซลล์เป็นสาเหตุให้เกิดความขุ่น ซึ่งอาจจะไปรบกวนต่อค่าความถูกต้องของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างอาหารเหลว ในความเป็นจริงตัวอย่างสำหรับการวัดสเปกโตรโฟโตเมตรีควรที่จะเป็นตัวอย่างที่เคลียร์ เพื่อลดความผิดพลาดที่จะให้เกิดขึ้นน้อยที่สุดซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสะท้อนหรือการกระจายของแสง (Shibata et al., 1954) การกระจายของแสงสามารถที่จะลดการส่งผ่านของแสงผ่านตัวอย่างซึ่งจะมีผลกับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ ในการทดลองใช้ 2 วิธีเพื่อการประเมิน ถ้าความขุ่นของเซลล์มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างภายใต้เงื่อนไขการทดลอง ในวิธีการทดลองแรก เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มีเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวที่มีสับเสตรทอะมิโนไลซีนและไม่มีไลซีนถูกนำมาวัด อาหารเหลวทั้ง 2 ถูก inculated ด้วยเชื้อ *S.* Anatum (6 log CFU/ml) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นควรที่จะให้ความขุ่นเดียวกัน ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ของทั้ง 2 ตัวอย่างถูกนำเสนอเนื่องจากปฏิกริยาการใช้ไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่นปราศจากการ interference จากความขุ่นที่เกิดขึ้นของเซลล์ ในวิธีที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ของตัวอย่างที่มีความขุ่นและตัวอย่าง supernatant ที่ชัดเจนโดยการ plot ค่าที่เวลาต่างๆ กับค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่อ่านได้ทั้งที่มีการเหวี่ยงแยกและไม่มีการเหวี่ยงแยกของอาหาร mLDB-PR ที่มีการใส่เชื้อ *Salmonella* ถูกนำมา plot และเปรียบเทียบกัน





รูปที่ 4.1 (a) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของอาหารเหลว mLDB-PR (●), mDB-PR (×, control สำหรับความขุ่นของเซลล์) ที่ใส่เชื้อด้วย *S.* Anatum (6 log CFU/ml) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากเพาะบ่มเชื้อแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงคิดจากค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างที่มีความขุ่น (O = ● − ×) ได้ถูกคำนวณและพล็อตกราฟในแต่ละเวลา ในแต่ละจุดของข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± SEM ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่ได้หักออก (●), และค่าการดูดกลืนแสงที่หักออก (O) ที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$).

(b) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ของอาหารเหลว mLDB-PR ที่ใส่เชื้อด้วย *S.* Anatum (6 log CFU/ml) ที่เวลาในการบ่มเชื้อต่างกัน แต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± SEM ที่เวลาจำเพาะ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่ได้เหวี่ยงแยก, (●) และที่เหวี่ยงแยก, (O) ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$).

รูปที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับเวลาของ *S.* Anatum ที่เจริญเติบโตใน mLDB-PR และ mDB-PR ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแรกที่เวลาช่วง (0 – 4 ชั่วโมง) ของทั้งคู่ของเซลล์ เนื่องจากเกิดการเฟอร์เมนเตชั่นของกรด, ซึ่งปรากฏสะท้อนเหมือนกันกับอัตราการเจริญเติบโตใน 2 อาหาร ค่าการดูดกลืนแสงที่ช้าในช่วง (6 - 24 ชั่วโมง) ของทั้ง 2 อาหารถูกพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ค่าการดูดกลืนแสงของ mDB-PR (เฉพาะเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตแต่ไม่ใช้ไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่น) ปรากฏมีความจำเป็นเป็น

ศูนย์ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียไม่มีผลต่อการอ่านของค่าการดูดกลืนแสง A_{550} นอกเหนือจากนั้น mLDB-PR ให้ค่าการดูดกลืนแสงอย่างเคลียร์เพิ่มขึ้นเนื่องจากปฏิกริยาไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่น ค่าการดูดกลืนแสงของ mLDB-PR ระหว่างเวลาของปฏิกริยาไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่น (6-24 ชั่วโมง) ก่อนและหลังการ substracting ด้วย mDB-PR พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงเริ่มต้นของค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการเฟอร์เมนเตชั่น (เซลล์มีการเจริญเติบโต) ของ mLDB-PR และ mDB-PR ถูกเท่ากันโดยเห็นได้จากช่วงเวลา 0 – 6 ชั่วโมงแรกของการบ่ม (4.1a)

การเหวี่ยงแยกเป็นวิธีที่สนับสนุนผลการทดลองข้างบน รูปที่ 4.1b แสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ที่เวลาของการเจริญเติบโตต่างๆ ของการเหวี่ยงแยกและไม่มีการเหวี่ยงแยกตัวอย่าง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $P < 0.05$) โดยทั้งคู่ของการเหวี่ยงแยกและการหักค่าการดูดกลืนแสงแสดงให้เห็นที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของ *S.* Anatum อยู่ที่ 6 log CFU/ml ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนถึงปริมาณเซลล์ประมาณ 8 – 9 log CFU/ml ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความขุ่น การ interfere ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญที่การอ่านของค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เนื่องจากปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น (รูปที่ 4.1) ภายใต้เงื่อนไขของการทดลอง การ detection ของการวัดด้วยสเปกโตรโฟโตเมตรีของปฏิกริยาการใช้เอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสในตัวอย่างที่มีความขุ่น (มากกว่า 9 log CFU/ml) สามารถที่จะมีความสะดวกและมีความถูกต้อง

เหมือนกับ colorimetric assays ที่มีความประสบสำเร็จในการที่จะสามารถวัดตัวอย่างเซลล์ที่ไม่โปร่งแสงทะลุผ่าน Yu et al. (2011) สามารถที่จะ detect ปฏิกริยาของเอนไซม์กลูตาเมทดีคาร์บอกซีเลสในตัวอย่างที่มีความขุ่นเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (cell suspension) โดยการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตรของพีเอชอินดิเคเตอร์โบรโมครีซอลกรีน McLaughlin (2007) ใช้คัลเลอร์เมทริคไมโครเพลท ในการทดสอบการมีชีวิตอยู่ของ *Salmonella* เซลล์ในตัวอย่างของเหลว suspension การเปลี่ยนแปลงของสี (สีเหลืองสว่างของอาหารเหลวไปเป็นสีแดงของ formazan ใน *Salmonella* มีความถูกต้องในการวัดที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร โดยปราศจากการ interference ของการปรากฏของเฟสและเซลล์ความขุ่นเนื่องจากการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

4.3 การตัดสินใจเลือกใช้ตัวยับยั้ง selective inhibitor

มันเป็นความจำเป็นสำหรับการเติมตัวยับยั้งในระหว่างที่ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* เพื่อให้ตัวยับยั้งดังกล่าวสามารถที่จะยับยั้งเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *E. aerogenes*, *E. coli*, *S. marcescens, K. pneumonia, P. mirabilis, S. sonnei*, และ *Y. enterocolitica* โดยเฉพาะใน 3 strains แรกที่เป็น LDC และ ODC ที่สามารถเกิดปฏิกริยาให้ผลเป็นบวกจำเป็นต้องยับยั้งโดยการใช้ตัวยับยั้งที่เหมาะสม

4.3.1 ตัวยับยั้งผสม (inhibitor mixture) จากสูตรอาหารมาตรฐาน

ในการทดลองเริ่มต้น ได้ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของสารตัวยับยั้งที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร media สารตัวยับยั้งที่ใช้ถูกนำมาจากส่วนประกอบของอาหารเหลวมาตรฐานที่ใช้กับเชื้อ *Salmonella* ในการเพิ่มจำนวน; MKTTn, SC, และ RVS อาหารแข็ง; xylose lysine deoxycholate agar, XLD; Hektoen enteric agar, HEA; และ bismuth sulfite agar, BSA และอาหารเหลวใหม่ KIMAN (Blivet et al., 1997) ผลการทดลองแสดงให้เห็นในส่วนของ 4.3.1 เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ของ D' Aoust et al., 1992; Chen et al., 1993; June et al., 1995; Schonenbrucher et al., 2008 แสดงให้เห็นความล้มเหลวในการใช้ตัวยับยั้งจากอาหารมาตรฐานบางตัวเพื่อที่จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์และแยกเซลล์ ดังนั้นพวกเราจึงดำเนินการศึกษาต่อถึงผลของตัวยับยั้งในอาหารที่ได้มีการพัฒนาโดยการใช้เทคนิค microchromatic

จากผลการทดลองการใช้สารยับยั้งเหล่านี้ในอาหารกรดอะมิโนไลซีนที่มีพีเอชอินดิเคเตอร์เป็นฟีนอลเรด (mLDB-PR) และอาหารกรดอะมิโนออร์นิธินที่มีพีเอชอินดิเคเตอร์เป็นฟีนอลเรด (mODB-PR) ในการทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* และเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของ LDC- และ ODC- ให้ผลเป็นบวก (A_{550} ของอาหารที่มีเชื้อ - A_{550} ของอาหารที่ไม่มีเชื้อ) ถูกใช้เป็นพารามิเตอร์สำหรับการเจริญเติบโตในแต่ละเชื้อที่เป็น DC-positive ตัวยับยั้งที่ดีควรที่จะยอมให้เชื้อ *Salmonella* โตได้ทั้งหมด แต่ไม่ยอมให้เชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella (DC-positive และ negative) สามารถโตได้ ปริมาณของตัวยับยั้งที่น้อยของ brilliant green (BG) ในอาหารเหลว *Salmonella* และ agar ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยไม่ทำลายเชื้อ *Salmonella* (Wilson และ Blair, 1926; van Schothorst et al., 1987) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาการใช้ BG ในอาหารเหลว mODB-PR สามารถยับยั้งการโตของ ODC – positive แบคทีเรียที่ทำการทดสอบโดย Cystine ใน SC แสดงให้เห็นว่าสามารถป้องกันเชื้อ *Salmonella* จากผลของการยับยั้งด้วยซีลีไนท์และ

กระตุ้น *Salmonella* ให้สามารถเจริญเติบโตได้ (North และ Bartram, 1953) อย่างไรก็ตามใน mLDB-PR ไม่สามารถที่จะป้องกันเชื้อ *Salmonella* บางตัวได้ ตัวยับยั้ง SC สำหรับเชื้อ *Salmonella* ที่เป็น LDC-positive (*S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi) ด้วยเหมือนกันกับ 1 LDC-positive (*Serratia marcescens*) และ 3 ODC-positive (*E. coli*, *P. mirabilis*, และ *Y. enterocolitica*) ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ใช่ Salmonella โดย June et al., (1995) และ Schonenbrucher et al., (2008) ได้รายงานว่าการใช้ SC ที่ปริมาณน้อยสามารถที่จะเพิ่มเชื้อ *Salmonellae* โดยส่วนใหญ่ แต่ไม่เพิ่มเชื้อซีโรวาร์ที่จำเพาะบางตัว เช่น *S.* Typhi และ *S.* Gallinarum ในการทดลองของเคสนี้ SC สามารถที่จะฟื้นเซลล์ของ 2 ซีโรวาร์นี้ได้ใน mODB-PR เพียงอย่างเดียว โพแทสเซียมไอโอไดด์, มาลาไคกรีน, และโนโวไบโอซิน ใน KIMAN อาหารเหลวใหม่สำหรับการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* บนพื้นฐานของสัญญาณการนำไฟฟ้าสำหรับเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ในการทดสอบกับตัวยับยั้ง เช่น *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *Serratia odorifera*, *C. freundii*, และ *Enterobacter cloacae* โดยไม่มีผลกระทบกับ 14 *Salmonella* ซึ่งส่วนใหญ่เป็น nontyphoid (Blivet et al., 1997) อย่างไรก็ตามใน mLDB-PR และ mODB-PR มันทั้งหลายสามารถที่จะยับยั้งไม่เพียงแต่เชื้อที่ไม่ได้เป็น *Salmonella* แต่ยังคงเป็นเชื้อที่เป็น LDC- และ ODC-positive typhoid และ paratyphoid *Salmonella* serovars เช่น *S.* Typhimurium, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi A

ตารางที่ 4.2 ผลของตัวยับยั้งที่ได้จากสูตรอาหารมาตรฐานต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonellae* และที่ไม่ใช่ *Salmonellae* (ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/ml) ในอาหารเหลว mLDB-PR (L) และ mODB-PR (O) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรสำหรับปฏิกิริยาการใช้ไลซีนและออร์นิธิน (+, ผลบวก, A_{550} ของตัวอย่าง $>$ A_{550} ของ control; -, ผลลบ, A_{550} ของตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ของ control) ที่ปรากฏใน *Salmonellae* และเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonellae* แกรมลบ ตัวอย่างควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	ไม่ใส่ตัวยับยั้ง		ตัวยับยั้งผสมที่เติม*													
			ST+ID+OG +BG+NB (MKTTn)		SN+CT (SC)		MG+MC (RVS)		SD (XLD)		BS (HEA)		BG (BSA)		PI+MG+NB (KIMAN)	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
กลุ่มเชื้อ Salmonella																
S. Anatum	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Choleraesuis	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Enteritidis	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Gallinarum	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S. Rissen	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Typhimurium	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S. Weltevreden	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. Typhi (ODC^-)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S. Paratyphi A (LDC^-)	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Paratyphi B	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
แบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช่ Salmonella																
Enterobacter aerogenes	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Escherichia coli	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Serratia marcescens	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Proteus mirabilis	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
แบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่ Salmonella																
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ST, sodium thiosulfate; ID, iodine solution; OG, Oxgall, BG, brilliant green; NB, novobiocin; SN, selenite; CT, cysteine; MG, malachite green; MC, magnesium chloride; SD, sodium deoxycholate; PI, potassium iodide. MKTTn, Muller-Kauffmann tetrathionatenovobiocin broth; SC, Selenite cystine; RVS, Rappaport-Vassiliadis soy broth; XLD, Xylose lysine deoxycholate agar; HEA, Hektoen enteric agar; BSA, Bismuth sulfite agar; KIMAN, a new selective broth (Blivet et al., 1998)

ตัวยับยั้งส่วนผสมจาก KMTTn ที่ใช้ใน mLDB-PR และ mODB-PR ทำให้เชื้อ *Salmonellae* ทั้งหมดและที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonellae* ตาย ในการทดลองใช้ Sodium deoxycholate และ bile salts ที่ความเข้มข้นที่ใช้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแข่งขัน แต่มันสามารถที่จะยับยั้งเชื้อ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi A ผลการทดลองของผู้วิจัยเห็นด้วยกับที่ review มาซึ่งได้รายงานในหลายๆ ชนิดของ bile salt สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางตัว ยกเว้นพวก enteric bacteria (Begley et al., 2005) ตัวยับยั้งจาก RVS (malachite green และ magnesium chloride) ในทั้ง mLDB-PR และ mODB-PR, brilliant green ใน mLDB-PR ไม่สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ได้ทั้งหมด และเชื้อบางตัวที่ไม่ใช่ *Salmonella* (4 LDC- และ 6 ODC-positive แบคทีเรีย) ที่ใช้ในการทดสอบท่ามกลางระหว่างสารตัวยับยั้งผสมที่ได้จากมาตรฐานที่นำมาทดสอบ เฉพาะตัวยับยั้ง RVS จะถูกนำไปทดสอบกับเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดในทั้ง mLDB-PR และ mODB-PR ตามที่ได้แสดงโดยการ shifting ของกราฟค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการเป็นผลบวกของ DC (Khueankhancharoen และ Thipayarat, 2014) ผู้วิจัยและนักค้นพบอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าตัวยับยั้ง RVS ในอาหาร media มาตรฐานเหนือกว่าด้วยเหมือนกัน ดังที่ได้สรุปในตารางที่ 4.1 และในอาหารเหลว dLDB-PR ที่ได้ถูกพัฒนา ตัวยับยั้ง RVS ทำให้เกิดการฟื้นฟูของเชื้อ *Salmonella* เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีความเข้มข้นที่สูงกว่าอาหาร media ที่ไม่มีตัวยับยั้ง RVS (Khueankhancharoen และ Thipayarat, 2014) ที่ความเข้มข้นของ magnesium chloride ที่สูงใน RVS ช่วยดูแลไม่ให้เกิดการตึงผิวของเซลล์ ของการเพิ่มจำนวนในอาหารที่มี pH ต่ำและสูง (Taskila et al., 2012)

4.3.2 ผลของตัวยับยั้งเดี่ยว (Individual inhibitors)

ในแต่ละองค์ประกอบของตัวยับยั้งที่เป็นส่วนประกอบในอาหารจำเพาะยกเว้น sodium deoxycholate และ bile salts (รวมถึง oxgall) ถูกนำมาทดสอบต่อไปโดยแยกเป็นชนิด ๆ ของตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะหาความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความจำเพาะสูงของ *Salmonella* ตัวยับยั้ง : tetrathionate (thiosulfate ผสมกับสารละลายไอโอดีน), ซีลีไนท์กับ cysteine, brilliant green, malachite green, magnesium chloride, potassium iodide, และ novobiocin

ไม่ขึ้นกับการเติมที่ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหาร mLDB-PR และ mODB-PR เพื่อที่จะทำการทดสอบโดยการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 สำหรับการเจริญเติบโตของ Salmonellae และที่ไม่ใช่ Salmonellae

ตัวยับยั้งโดยส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบที่น้อยที่สุดไม่สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ DC positive แบคทีเรีย เช่น *E. aerogenes*, *E. coli* และหรือ *S. marcescens* เชื้อเหล่านี้ไม่ sensitive กับตัวยับยั้งเหล่านี้ที่ความเข้มสูง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 malachite green ที่ความเข้มข้น 40 – 100 mg/L สามารถที่จะยับยั้ง *K. pneumoniae* ใน lysine-based broth ที่ความเข้มข้น 60 mg/L และที่สูงกว่า *S.* Typhi สามารถที่จะถูกยับยั้งได้เหมือนกัน สำหรับอาหารเหลวออร์นิธิน มาลาไคกรีน 40 mg/L ยอมให้มีการโตของเชื้อ *Salmonella* ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด ในขณะที่สามารถยับยั้ง 3 ของ 6 ODC-positive ที่เป็นเชื้อแข่งขัน เช่น *P. mirabilis*, *S. sonnei*, และ *Y. enterocolitica* อย่างไรก็ตาม มาลาไคกรีนที่ความเข้มข้นทั้งหมดไม่สามารถที่จะยับยั้งเชื้อเป้าหมาย *E. aerogenes*, *E. coil*, และ *S. marcescens* โดยไม่กระทบกับการฟื้นตัวของ *Salmonella* ผลของตัวยับยั้งของมาลาไคกรีนที่มีต่อ *Salmonella* เริ่มต้นที่ปริมาณ 100 mg/L สำหรับอาหารเหลวไลซีน และ 80 mg/L สำหรับอาหารเหลวออร์นิธิน มาลาไคกรีนในระดับความเข้มข้นดั้งเดิมของ Rappaport (108 mg/L) ถูกลดลงเป็น 36 mg/L ในตัวยับยั้งของอาหารเหลว RVS โดยส่วนใหญ่ เนื่องจากมันค่อนข้างที่จะมีความเป็นพิษสูงใน *S.* Paratyphi A (Rappaport และ Konforti, 1959; Busse, 1995) เป็นที่น่าสนใจว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นเกลือออสโมติก มีประสิทธิภาพของตัวยับยั้งที่ดีสำหรับในหลายๆ แบคทีเรีย โดยเฉพาะ *E. coli* และ *Proteus* แต่ไม่มีผลใน *Salmonella* ซึ่งสามารถที่จะอดทนต่อความตึงผิวของเซลล์ที่สูงมาก (Rappaport et al., 1956) ผลการทดลองของพวกเราแสดงให้เห็นว่า mLDB-PR กับแมกนีเซียมคลอไรด์ 50 g/L (LMC) มีประสิทธิภาพส่วนใหญ่ในการยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถใช้ไลซีน (LDC-positive) และออร์นิธิน (ODC-positive) แต่ไม่ spared กับเชื้อ *Salmonellae* ทั้งหมด มันยับยั้งเชื้อ 4 LDC-positive ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบยกเว้น *E. aerogenes* และ *E. coli* อาหารเหลวชนิด mODB-PR ที่มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 50 g/L (OMC) สามารถที่จะยับยั้งเชื้อแข่งขันที่สามารถใช้ออร์นิธิน (ODC-positive) ได้ทั้งหมด ยกเว้น *E. aerogenes*, *P. mirabilis* และ *S. sonnei*. Restaino et al. (1977) ได้รายงานว่า novobiocin ที่มากกว่า 150 mg/L สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* บนอาหาร TSA และ delayed การฟื้นตัวหรือ recovery ของเชื้อ *Salmonella* พวกเราพบว่า novobiocin ที่ 20 mg/L สามารถที่จะ

ยับยั้งเชื้อที่สามารถใช้ออร์นิธิน ODC-positive (*E. aerogenes*, *E. coli* และ *P. mirabilis*) โดยปราศจากการฆ่าเชื้อ Salmonellae

ประสิทธิภาพความสามารถของสารยับยั้งในอาหารเปลี่ยนสีถูกแสดงในตารางที่ 4.3 การใช้อาหารเหลวจำเพาะที่พัฒนาทั้ง 7 ชนิดสามารถที่จะฟื้นตัวเพิ่มจำนวนเชื้อของ *Salmonella* serovars ได้ทั้งหมด รวมทั้ง typhoid, paratyphoid และที่ไม่ใช่ typhoid ดังนั้นพวกเราจึงนำเสนอการใช้อาหารจำเพาะจากกรดอะมิโนชนิดใหม่ (new amino-acid decarboxylase - AADC) ที่เป็น mLDB-PR, mODB-PR, LRVS, ORVS, LMC, OMC และ ONB เป็นอาหารเบื้องต้นในการ screening เชื้อ *Salmonella* ในขั้นตอน selective enrichment step. อาหารเหลวจำเพาะเหล่านี้ดีกว่าอาหารเหลวจำเพาะมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

ตารางที่ 4.3 ผลของตัวยับยั้งเดี่ยวในอาหารเหลวจำเพาะถูกใช้ในการอธิบายกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (+, ผลบวก, A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม; -, ผลลบ, A_{550} ตัวอย่าง $\leq A_{550}$ ควบคุม) สะท้อนให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของ *Salmonellae* และที่ไม่ใช่ *Salmonellae* (7 log CFU/ml) ในอาหารเหลว mLDB-PR (L) และ mODB-PR (O) ที่การบ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างควบคุม (control) เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีการ inoculation ของเชื้อ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	ไม่ใส่ตัวยับยั้ง		ตัวยับยั้งแต่ละชนิดและความเข้มข้นที่ใช้													
			MG (มิลลิกรัม/ลิตร)					MC (กรัม/ลิตร)					NB (มิลลิกรัม/ลิตร)			
			40 60 80	100	40 60	80	100	40 50	60	40	50	60	140	160	20	60
	L	O	L			O		L			O		L		O	
กลุ่มเชื้อ Salmonella																
S. Anatum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Choleraesuis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S. Gallinarum	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
S. Rissen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. Typhimurium	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S. Weltevreden	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Typhi (ODC^-)	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
S. Paratyphi A (LDC^-)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
S. Paratyphi B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แบคทีเรียแกรมลบ ที่ไม่ใช่ Salmonella																
Enterobacter aerogenes	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Escherichia coli	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Serratia marcescens	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Proteus mirabilis	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Yersinia enterocolitica	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
แบคทีเรียแกรมบวก ที่ไม่ใช่ Salmonella																
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MG, malachite green; MC, magnesium chloride; NB, novobiocin

ตารางที่ 4.4 สรุปความสามารถในการ selectivity ของอาหารเหลว 7 ชนิดที่ได้มีการพัฒนาซึ่งมีการ inoculated ในแต่ละอาหารด้วยเชื้อ *salmonellae* และที่ไม่ใช่ *salmonellae* ด้วยปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	ปฏิกริยาไลซีน	ปฏิกริยาออร์นิธิน	อาหารเหลวปฏิกริยาไลซีน*			อาหารเหลวปฏิกริยาออร์นิธิน*			
			mLDB-PR	LRVS	LMC	mODB-PR	ORVS	OMC	ONB
กลุ่มเชื้อ Salmonella									
S. Anatum	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Choleraesuis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Gallinarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Rissen	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Typhimurium	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Weltevreden	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S. Typhi (ODC^-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-
S. Paratyphi A (LDC^-)	-	+	-	-	-	+	+	+	+
S. Paratyphi B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แบคทีเรียแกรมลบ ที่ไม่ใช่ Salmonella									
Enterobacter aerogenes	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Escherichia coli	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Citrobacter freundii	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Proteus vulgaris	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Psuedomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Yersinia enterocolitica	-	+	-	-	-	+	+	-	+
แบคทีเรียแกรมบวก ที่ไม่ใช่ Salmonella									
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนสีที่การวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 550 นาโนเมตรของตัวอย่างอาหารเหลวที่มีการ inoculation ของเชื้อที่สัมพันธ์กับตัวอย่างควบคุม (สอดคล้องกับอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ) และอธิบายปฏิกริยาให้ผลเป็นบวกของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (+) สะท้อนการเจริญเติบโตของเซลล์และผลเป็นลบของปฏิกริยา (-) สะท้อนความสามารถในการยับยั้ง.

(+,ผลบวก, A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม; -, ผลลบ, A_{550}ตัวอย่าง $\leq A_{550}$ ควบคุม)

4.4 Detection limit

ประสิทธิภาพของอาหารเหลวจำเพาะทั้ง 7 ชนิด AADC ถูกประเมินความสามารถในการฟื้นตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรีย *Salmonella* ทั้งที่เป็น typical และ atypical บนพื้นฐานของการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (ตารางที่ 4.5) ในแต่ละ *Salmonella* ซีโรวาร์ ตามตารางที่ 4.1 ปริมาณเซลล์ 20 μL ของปริมาณเชื้อจาก 1 – 8 log CFU/ml อาหารเหลวจำเพาะใหม่ที่พัฒนา (7 AADC) ซึ่งเป็น mLDB-PR, mODB-PR, LRVS, ORVS, LMC, OMC และ ONB ถูกเติมที่ปริมาณ 180 μL ใน 96-well microplate เมื่อทำการใส่เซลล์ลงในอาหารทั้ง 7 ชนิด อาหารเหลว AADC ดังกล่าวถูกนำมาประเมินประสิทธิภาพด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (A_{550}) ระหว่าง 24 ชั่วโมงของการบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 37±1°C และผลการทดลองที่เป็นบวก/ลบ จากปฏิกริยาของเอนไซม์ decarboxylase ถูกดำเนินการศึกษาต่อไป

เชื้อ typical ซีโรวาร์ เพิ่มจำนวนที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1 log CFU/ml ในอาหาร mLDB-PR, ปริมาณเซลล์ 1-2 log CFU/ml ใน LRVS, mODB-PR, ORVS, OMC และ ONB, และ 1-3 log CFU/ml ใน LMC ดังนั้นอาหาร AADC ทั้งหมดถูกแนะนำสำหรับตัวอย่างที่มีเชื้อ typical ซีโรวาร์ ตัวยับยั้งก่อนหน้านี้ ตัวอย่างควรที่จะมีการ pre-enriched เพิ่มจำนวนเพื่อที่จะ resuscitate เซลล์ที่บาดเจ็บ และเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่อย่างน้อย 5 log CFU/ml เพื่อให้เชื้อสามารถต้านทานในอาหารเหลวจำเพาะใน step ที่ 2 ก่อนนำไปสู่การ streak ลงบนอาหารแข็ง (Chen et al., 1993; Hammack et al., 2003) ท่ามกลางอาหารมาตรฐานที่เป็นอาหารเหลวไม่จำเพาะ (non-selective pre-enrichment) บัฟเฟอร์เปปโตนวอเตอร์ (BPW) เป็นอาหารเหลวไม่จำเพาะที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับ *Salmonella* ในการฟื้นตัวเพิ่มจำนวนในอาหารที่หลากหลายชนิด (de Boer, 1998; Baylis et al., 2000) สำหรับอาหารมาตรฐานเหลวไม่จำเพาะที่มีการพัฒนาที่เป็น universal pre-enrichment broth (UPB) ได้มีการพัฒนาสำหรับการฟื้นเซลล์หรือเพิ่มจำนวนของ *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* ในการเพิ่มจำนวน (ISO, 2002; Taskila et al., 2012) Pre-enrichment ของ UPB ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ *Salmonella* ที่บาดเจ็บด้วยความร้อน ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่น้อยเพื่อให้ได้เซลล์เพิ่มจำนวนถึง 6 log CFU/ml ในเวลา 24 ชั่วโมง (Bailey และ Cox, 1992; Jiang et al., 1998; Hammack et al., 2003)

สำหรับบาง AADC broths แสดงให้เห็นว่ามีการ recovery ที่สูงของ atypical *Salmonella* (*S.* Gallinarum, *S.* Typhi, และ *S.* Paratyphi A) ปริมาณเซลล์ที่จำกัดสำหรับ *S.* Gallinarum เป็น 1 log CFU/ml (ORVS), 2 log CFU/mL (LRVS, mODB-PR) และ 3 log CFU/mL (mLDB-PR) นอกเหนือจากนั้น *S.* Gallinarum สามารถ

มีชีวิตใน OMC และ ONB ที่ปริมาณเซลล์ 6 log CFU/ml อาหาร mLDB-PR และ LRVS เป็นตัวยับยั้งส่วนใหญ่สำหรับการฟื้นตัวของเซลล์และการตรวจวิเคราะห์ *S.* Typhi (ODC-negative) ด้วยปริมาณเซลล์ที่จำกัดที่ 1-2 log CFU/mL สำหรับ *Salmonella* ที่ให้ผลเป็นลบของปฏิกริยา LDC-negative, *S.* Paratyphi A อาหาร mODB-PR, ONB และ ORVS แสดงให้เห็นมีการฟื้นตัวของเซลล์ที่ดีที่ 1-3 log CFU/mL การตรวจสอบ screening เบื้องต้นของ *Salmonella* โดยการใช้อาหาร selective enrichment media ที่นำเสนอเหล่านี้สามารถที่จะดำเนินการได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและให้ผลที่ถูกต้องด้วยปริมาณของสารตัวยับยั้งที่เหมาะสม การให้ผลที่เป็นลบแต่ตัวอย่างมีการติดเชื้อจริงสามารถที่จะลดปริมาณได้เพราะ *Salmonella* มีแนวโน้มที่สูงที่สามารถฟื้นตัวโดยปราศจากการฆ่าจากความเป็นพิษของตัวยับยั้งที่มากเกินไป

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อจำกัด (detection limit) ในอาหารเหลวจำเพาะที่นำเสนอ AADC สำหรับเชื้อที่เป็น typical และ atypical *Salmonella* ซีโรวาร์ บ่มอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความสามารถในการ detectability อยู่บนพื้นฐานของการเพิ่มค่าการดูดกลืนแสงใน A_{550} ของอาหารเหลวที่มีเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับ control (ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ). +, สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม); -, ไม่สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง = A_{550} ควบคุม); x, ไม่สามารถตรวจพบ (A_{550} ตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ควบคุม) เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ไลซีนและออร์นิทีนดีคาร์บอกซีเลส

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	อาหารเหลว	ปริมาณเซลล์เริ่มต้น, log CFU/ml							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Typical *Salmonella*									
S. Enteritidis	mLDB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+
	LRVS	+	+	+	+	+	+	+	+
	LMC	+	+	+	+	+	+	+	+
	mODB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+
	ORVS	+	+	+	+	+	+	+	+
	OMC	+	+	+	+	+	+	+	+
	ONB	-	-	+	+	+	+	+	+
S. Typhimurium	mLDB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+
	LRVS	-	+	+	+	+	+	+	+
	LMC	-	+	+	+	+	+	+	+
	mODB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+
	ORVS	+	+	+	+	+	+	+	+
	OMC	+	+	+	+	+	+	+	+
	ONB	-	-	-	+	+	+	+	+
Atypical *Salmonella*									
S. Typhi	mLDB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+

(ODC-negative)	LRVS	-	+	+	+	+	+	+	+
	LMC	-	-	-	-	+	+	+	+
	mODB-PR	x	x	x	x	x	x	x	x
	ORVS	x	x	x	x	x	x	x	x
	OMC	x	x	x	x	x	x	x	x
	ONB	x	x	x	x	x	x	x	x
S. Paratyphi A	mLDB-PR	x	x	x	x	x	x	x	x
(LDC-negative)	LRVS	x	x	x	x	x	x	x	x
	LMC	x	x	x	x	x	x	x	x
	mODB-PR	+	+	+	+	+	+	+	+
	ORVS	-	-	+	+	+	+	+	+
	OMC	-	-	-	-	+	+	+	+
	ONB	-	+	+	+	+	+	+	+

4.5 การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค protocol และ media ที่ได้มีการพัฒนาในตัวอย่างที่มีการ spiked

เพื่อที่จะสำรวจประสิทธิภาพของ microplate assay ด้วยอาหารเหลว อาหาร AADC ที่ได้มีการพัฒนาจะถูกนำไปทดสอบกับตัวอย่างอาหารจริง การปนเปื้อนของเชื้อตามธรรมชาติในอาหารและการเติมเชื้อลงไปในอาหารถูกสร้างขึ้นมาเพื่อใช้กับอาหารที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (pasteurized milk), อาหารของแข็ง (cooked chicken) และอาหารที่มีความซับซ้อนหลายมิติ (ready – to – eat) ที่ปริมาณของเซลล์ต่ำ (50 – 150 เซลล์) เชื้อลิสทีเรียและเชื้อซัลโมเนลลาถูก spiked ลงในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีจำหน่ายโดยทั่วไป เช่น นม ไข่ เนื้อ ซึ่งถูกใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของรูปแบบการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนา และการพัฒนาอาหาร (Peng และ Shelef, 2001) คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างอาหารที่เหมือนกันในการ spiked เชื้อลงไปเพื่อที่จะนำไปสู่การศึกษาประสิทธิภาพของ AADC broth ที่แตกต่างกันด้วยเทคนิคไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ให้ผลรวดเร็ว ตัวอย่างอาหารทั้งหมดถูกวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ตามมาตรฐาน ISO 6579:2002 เพื่อให้ได้ผลที่เป็นอ้างอิง ตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัมที่มีการปนเปื้อนธรรมชาติ (naturally) กับที่ไม่มีเชื้อ *Salmonella* เป็น background เช่น ไข่ต้ม, เนื้อไก่สุก, และ stir-fried basil chicken with rice ถูก spiked ด้วยเชื้อปริมาตร 1 mL ของ *S.* Typhimurium ที่ปริมาณเชื้อ 1 log CFU/mL ตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัม ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย (sterile milk) ถูก spiked ด้วยแบคทีเรียที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ : (a) 1 mL ของ *S.* Typhimurium ที่ปริมาณเซลล์ 1 log CFU/mL, (b) 1 mL ของ *S.* Typhimurium ที่ปริมาณเซลล์ 1 log CFU/mL และ 1 mL ของ *E. coli* ที่ปริมาณเซลล์ 1 log CFU/mL (ตัวแทนของเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกริยาได้ทั้ง LDC- และ ODC-positive), (c) 1 mL ของ *E. coli* ที่ปริมาณเซลล์ 1 log CFU/mL, (d) 1 mL ของ *P. vulgalis* ที่ปริมาณเซลล์ 1 log CFU/mL (ตัวแทนของเชื้อที่สามารถเกิดปฏิกริยาได้ทั้ง LDC- และ ODC-negative) เมื่อ

อาหารได้มีการเพิ่มจำนวน (pre-enriched) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว จะถูกนำไปทดสอบกับอาหาร AADC เช่น mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, และ ONB จากนั้นบ่มที่ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ถูกอธิบายตีความ

เป้าหมายเพื่อการใช้งานที่สะดวก ขั้นตอนไม่ยุ่งยากสำหรับการทดสอบตัวอย่างอาหารจริงเพื่อแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างอาหารปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นพวกเราใช้อาหารอะมิโน AADC broths เพื่อแสดงให้เห็นการไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonellae* ในตัวอย่างอาหารโดยการไม่ปรากฏสีเปลี่ยนจากเหลืองไปเป็นสีชมพู ให้ผลการทดลองเป็นลบในทั้ง อาหาร LDC และ ODC บนพื้นฐานของ Ewing (1986) หนึ่งในชีวเคมีที่ใช้ในการบ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella* และ Enterobacteriaceae เป็นการทดสอบการใช้กรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่น (Moeller, 1955; Falkow, 1958) มีบางคำแนะนำซึ่ง *S.* Paratyphi A เป็น LDC – negative และ ODC-positive และในทางกลับกัน สำหรับ *S.* Typhi ดังนั้นผลที่ให้เป็นลบจากทั้ง LDC- และ ODC-based ถูกมีความจำเป็นในการบ่งบอกชี้ชัดการไม่มีของเชื้อ *Salmonellae* ตัวอย่างถูกยอมรับว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ตัวอย่างบางตัวอย่างอาจมีการปนเปื้อนโดยตามธรรมชาติทั้งที่เป็น *Salmonella* และที่ไม่ใช่ *Salmonellae* ดังนั้นตัวอย่างเหล่านี้อาจจะให้ผลบวกในอาหารที่มีหรือไม่มีตัวยับยั้ง ในเคสเหล่านี้ขั้นตอนของการ subsequent ตามโปรโตคอลมาตรฐานที่ประกอบไปด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งจำเพาะและการทดสอบเชิงชีวเคมีและซีโรโลยีควรที่จะดำเนินการทดสอบต่อไป

ในตารางที่ 4.6 เชื้อ *Salmonella* ทั้งหมดถูก spiked ลงในตัวอย่างนมให้ผล LDC- และ ODC-positive ในตัวอย่าง 7 AADC broths เมื่อตัวอย่างนมปราศจากเชื้อถูก spiked ด้วยแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้ LDC – และ ODC เช่น *P. vulgaris* อาหารเหลว AADC ให้ผลเป็นลบ ส่งผลให้มีการแยกที่ชัดเจนระหว่างเชื้อที่ให้ผลเป็น DC-positive และ negative ในตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน ตัวอย่างนมปราศจากเชื้อที่ไม่มีการ spiked ของเชื้อแสดงให้เห็นปฏิกริยาอะมิโนที่เป็นลบ (DC-negative) ด้วย *E. coli* (LDC- และ ODC-positive) spiked ลงในตัวอย่าง ตัวยับยั้งที่ใช้แสดงให้เห็นความสามารถในการคัดเลือกที่แตกต่างกันในอาหารเหลว LDC และ ODC โดยเชื้อ *E. coli* ที่ทำการ spiked ลงในตัวอย่างอาหารเจริญเติบโตใน LMC และ LRVS และย่อยสลายไลซีน เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเหลวสีชมพูในทุกอาหารที่เป็นไลซีน

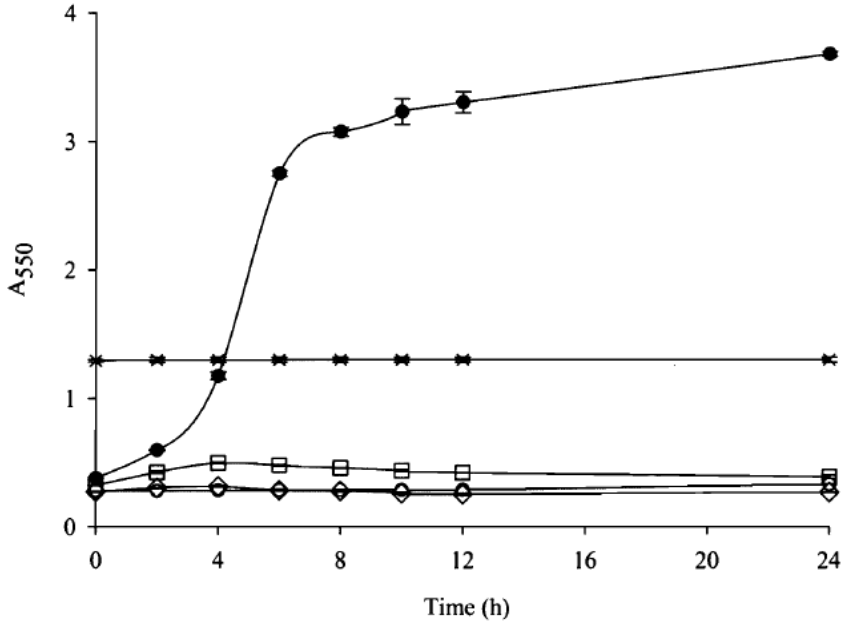
อาหารเหลวจำเพาะออร์นิธิน นอกเหนือจากนั้น สามารถที่จะแยกเชื้อ *Salmonella* จาก *E. coli* ในเงื่อนไขที่จำเพาะนี้ ตัวยับยั้งในอาหาร ORVS, OMC, และ ONB ดำเนินการในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ในการทดลอง

ตัวอย่างนมที่ spiked ได้เป็นอย่างดี ในการทดลองกับเชื้อบริสุทธิ์, MC 50 g/L ใน mODB-PR (OMC) และ NB 20 mg/L ใน ONB แต่ไม่ในมาลาไคกรีนและแมกนีเซียมคลอไรด์ใน ORVS ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น 7 log CFU/mL (Table 4.3) ความแตกต่างของตัวยับยั้ง RVS บางทีเนื่องจากปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่สูง เพียงพอที่จะ overcome ผลของตัวยับยั้งซึ่งโดยทั่วไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (Table 4.2) และปริมาณเซลล์เริ่มต้น (Table 4.5) โดยเพิ่มเติม ตัวอย่างที่มีการ spiked มีความเป็นกรดที่สูงหลังจากทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ (pre-enrichment step) Rappaport et al., (1956) ได้รายงานผลของการทำงานร่วมกันที่ pH ต่ำ และมาลาไคกรีนและแมกนีเซียมคลอไรด์ในการส่งเสริมคัดเลือกการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. แต่ไม่สนับสนุนการคัดเลือกเชื้อแข่งขันอื่นๆ ความเป็นกรดในอาหารเหลวเป็นผลมาจากใส่เชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนหรือฟื้นฟูเซลล์ในอาหาร non-selective enrichment เป็นผลให้เกิดสภาวะที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonellae* ในอาหารเหลวจำเพาะกรดอะมิโนทั้งหมด (AADC) รูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 เทียบกับเวลาของตัวอย่างนมสเตอริไรส์ทำการ spiked ด้วยแบคทีเรียที่แตกต่างกันระหว่างการบ่มตัวอย่างในตัวยับยั้ง OMC ที่ 37 °C ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 ของตัวอย่างนมที่ spiked ด้วย *S.* Typhimurium แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนโดยให้ค่าเพิ่มมากกว่า A_{550} ของ OMC ที่เป็นตัวอย่าง control, ตัวอย่างนมที่ไม่มีการ spiked ของเชื้อ, และ ODC-negative ที่เป็นเชื้อ *P. vulgaris* ที่ได้ spiked ลงในนมอย่างชัดเจน *E. coli* ถูกคัดเลือกยับยั้งใน OMC ดังนั้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{550} ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองจากการ spiked ลงในตัวอย่างอาหารชี้ให้เห็นว่าเทคนิค chromatic microplate บนพื้นฐานของ DC activity ของ *Salmonella* และ Enterobacteriaceae มีประสิทธิภาพที่เชื่อถือได้โดยปราศจากการแทรกของอนุภาคจากอาหารและความขุ่น

ตารางที่ 4.6 การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่มีการ spiked และมีเชื้อโดยธรรมชาติในอาหารเหลว 7 AADC สำหรับการคัดเลือกจำเพาะและ simultaneously detection ของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลส x, ไม่มี; ✓, มี; -, ผลลบ DC, +, ผลบวก DC Control ถูกสอดคล้องกับตัวอย่างอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ

ตัวอย่างอาหาร	การปนเปื้อน				อาหาร AADC ที่มีการใช้ปฏิกริยาไลซีนหรือออร์นิทีน						
	การเติมเชื้อ (spiked)			ปกติ	mLDB-PR	LRVS	LMC	mODB-PR	ORVS	OMC	ONB
	S. Typhimurium	*E. coli*	*P. vulgaris*								
Sterile Milk	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	✓	x	x	x	+	+	+	+	+	+	+
	x	x	✓	x	-	-	-	-	-	-	-
	x	✓	x	x	+	+	+	+	-	-	-
	✓	✓	x	x	+	+	+	+	+	+	+
Cooked chicken meat	x	x	x	✓	-	-	-	-	-	-	-
	✓	x	x	✓	+	+	+	+	+	+	+
Chilled stir-fried basil chicken with rice	x	x	x	✓	-	-	-	-	-	-	-
	✓	x	x	✓	+	+	+	+	+	+	+
Chilled boiled eggs	x	x	x	✓	+	-	-	+	+	-	+
	✓	x	x	✓	+	+	+	+	+	+	+

* ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนสีที่การวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ 550 นาโนเมตรของตัวอย่างอาหารเหลวที่สัมพันธ์กับตัวอย่างควบคุม (สอดคล้องกับอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ) และอธิบายปฏิกริยาให้ผลเป็นบวกของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (+) สะท้อนการเจริญเติบโตของเซลล์และผลเป็นลบของปฏิกริยา (-) สะท้อนความสามารถในการยับยั้ง. (+,ผลบวก, A_{550} ตัวอย่าง > A_{550} ควบคุม; -, ผลลบ, A_{550} ตัวอย่าง $\leq$ A_{550} ควบคุม)



รูปที่ 4.2 A_{550} ค่า absorbance เทียบกับเวลาของตัวอย่างนมที่ spike และไม่ spike ด้วยแบคทีเรียปริมาณ 10 CFU ต่อตัวอย่าง 25 ml แต่ละข้อมูลมาจากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± SEM ตัวอย่างถูกบ่มในอาหารจำเพาะ OMC ที่อุณหภูมิ 37 °C นมปราศจากเชื้อถูก spiked ด้วย *S.* Typhimurium (●), ODC-positive *E. coli* (□), ODC-negative *P. vulgalis* (◊), นมปราศจากเชื้อที่ไม่มีการเติมเชื้อ (O), อาหารเหลว OMC ที่ไม่มีการเติมเชื้อ (×).

เพื่อที่จะประเมินผลกระทบของการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยธรรมชาติที่มีอยู่ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* โดยการใช้วิธีและอาหารที่ได้มีการพัฒนา ชนิดของอาหารที่ใช้ที่แตกต่างกัน เช่น เนื้อไก่ต้ม (cooked chicken meat) ข้าวกะเพราไก่ (chilled stir-fried basil chicken with rice) และไข่ต้ม (chilled boiled eggs) ถูกนำมาทดสอบ เนื้อไก่ต้มและข้าวกะเพราะไก่ที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ *Salmonella* ที่ให้ผล positive และ negative ตามลำดับ ผลจากอาหาร AADC broth ทั้งหมดถูกมีการดำเนินการทดสอบเพื่อยืนยันผลกับวิธีการมาตรฐานของ ISO 6579:2002 สำหรับการวิเคราะห์ *Salmonella* ตัวอย่างไข่ต้มที่ไม่ได้เติมเชื้อ *Salmonella* ให้ผลเป็น negative กับปฏิกริยาอะมิโนใน LRVS, LMC, และ OMC อาหารจำเพาะทั้ง 3 ชนิดเหล่านี้มีการเติมตัวยับยั้งที่สามารถกดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็น background สำหรับอาหารอาหารเหลวอีก 4 ชนิด : mLDB-PR, mODB-PR (ไม่มีตัวยับยั้ง), ORVS, และ ONB (มีตัวยับยั้ง) ไม่มีผลกระทบในการยับยั้งกับเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ที่เป็น background และดังนั้นแสดงให้เห็นว่า DC-positive *Salmonella* และที่

ไม่ใช่ *Salmonella* ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า LRVS, LMC, และ OMC ให้ผลที่ดีในการคัดเลือกของการ detection เชื้อ *Salmonella* เพราะว่ามันสามารถที่จะเลือกยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแข่งขันและสามารถตรวจ detect เชื้อ *Salmonella* ได้ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่ำ

อาหารเหลว AADC ถูกออกแบบเพื่อใช้ในการ screen ตัวอย่างที่มีความเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* โดยเป้าหมายแรกเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการเกิดผล false negative การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนด้วย *Salmonella* สามารถที่จะตรวจพบได้ในอาหาร AADC ทั้งหมด โดยผลประโยชน์หลักของงานวิจัยนี้เพื่อที่จะจัดการตัดสินใจตรวจเช็คการปนเปื้อนของ *Salmonella* ภายใน 48 ชั่วโมง ที่สามารถให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งใช้เวลา 72 ชั่วโมง โดยการใช้หลักการการทดสอบด้วยการบ่งชี้ด้วยปฏิกริยาที่สามารถให้สี สำหรับปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนในระหว่างขั้นตอนการฟื้นฟูเพิ่มจำนวนอาหารเหล่านี้มีการยืนยันว่าตัวอย่างมีการปราศจากเชื้อจาก *Salmonella* ซึ่งถ้าอาหารทั้งหมดแสดงกิจกรรมการใช้กรดอะมิโนที่ไม่มี ถ้าตัวอย่างอาหารอย่างน้อย 1 อาหาร แสดงว่าตัวอย่างให้ผลเป็นบวกที่จำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไปซึ่งจะเป็นการใช้อาหารแข็งจำเพาะ หรืออาหารโครโมเจนิกถูกมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการตัดสินใจว่ามีความเป็นไปได้ที่จะให้ผลเป็น false positive ของอาหารจำเพาะ AADC สำหรับอาหารเหลวบ่งชี้สีอีกชนิดหนึ่งที่พัฒนามาจากการใช้ไทโอซัลเฟตที่มีความจำเพาะกับเชื้อส่วนใหญ่ของ *Salmonella* มันสามารถที่จะถูกใช้ควบคู่กับอาหาร AADC เพื่อเอาชนะความเป็นไปได้ที่จะให้ผลการทดลองเป็น false positive โดยการใช้อาหารเหลวจำเพาะ AADC การใช้ประสบการณ์ที่ได้รับจากการพัฒนาในระดับเล็กของ AADC การพัฒนารูปแบบอาหารต่อไปเป็นงานที่ได้มีการผลิตเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กที่เป็นการใช้ปฏิกริยาไธโอซัลเฟตรีดักเตส สำหรับเพื่อการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ที่เป็นกิจวัตรที่ให้ผลที่ปราศจาก false negative หรือ positive results

นอกเหนือจากการใช้หลักการการใช้กรดอะมิโน (AADC; amino acid decarboxylation) ปฏิกริยา biochemical อีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการทดสอบ เป็นปฏิกริยาการรีดักชั่นของไธโอซัลเฟตเพื่อได้ไฮโดรเจนซัลไฟต์ ปฏิกริยาดังกล่าวถูกนำมาทำให้เกิดประโยชน์ด้วยเหมือนกันเพื่อที่จะทำให้เกิดความสมบูรณ์ของการวัดด้วยกิจกรรม AADC เพื่อที่จะให้ได้ประสิทธิภาพในการ screening ของเชื้อ *Salmonella* ที่ดีมีประสิทธิภาพมากขึ้น การรีดักชั่นของไธโอซัลเฟตเพื่อเป็นไฮโดรเจนซัลไฟต์ได้มีความสำเร็จมาอย่างยาวนานในการแยกความแตกต่างของ *Salmonella* spp. จากเชื้อแข่งขัน Enterobacteriaceae ที่มีคุณสมบัติ

ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียแข่งขันที่มีความสำคัญ เช่น Proteus, *Citrobacter*, และ *Arizona* ยังคงให้ผลที่เป็น positive สามารถให้ผลการใช้ไฮโดรเจนซัลไฟต์ได้เช่นเดียวกัน แต่มันทั้งหลายให้ผลที่เป็น negative ใน DC ของกรดอะมิโนบางตัว ในทางตรงกันข้ามอาหารไฮโดรเจนซัลไฟต์ไม่สามารถที่จะแยกเชื้อ *Salmonella* ที่สำคัญบางตัว เช่น *S.* Cholereasuis, *S.* Gallinarum, *S.* Paratyphi A ได้ (Barrett และ Clark, 1987; Shelef และ Tan, 1998) ดังนั้นเพื่อให้ได้การ screening ของเชื้อ *Salmonella* ที่มีความปลอดภัยสูง อาหารเหลว H_2S ควรที่จะพัฒนาเพื่อใช้เป็นอาหาร chromatic broth ที่ 2 เพื่อสนับสนุนอาหาร AADC

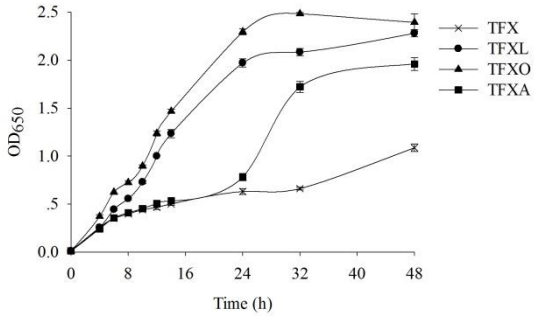
4.6 การพัฒนาสูตรอาหารการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella*

การรีดักชั่นของไทโอซัลเฟตไปเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์มีความสำเร็จในการผสมผสานทำงานร่วมกันเพื่อทดสอบการบ่งชี้และแยกความแตกต่างของเชื้อ *Salmonella* spp. โดยส่วนใหญ่จากสปีชีส์อื่นๆ ของ Enterobacteriaceae (Barrett และ Clark, 1987; Shelef และ Tan, 1998) กิจกรรมของปฏิกริยานี้มีความสัมพันธ์ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับ *Salmonella* และมีเชื้อบางตัวที่ไม่ใช่ *Salmonella* สามารถที่จะเกิดปฏิกริยาดังกล่าวได้ เช่น *Proteus* และ *Citrobacter* (Park et al., 2012) ปฏิกริยาดังกล่าวโดยปกติมันถูกนำไปใช้ควบคู่กับอาหารจำเพาะแข็งเพื่อคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* เช่น ไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่นในไลซีนไอรอน agar และไซโลสไลซีนดีคาร์บอกซีเลส agar ด้วยเหมือนกัน ด้วยตัวยับยั้งที่หลากหลายใช้ในการบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของโคโลนีเชื้อ *Salmonella* เบื้องต้นและเพื่อเป็นการยืนยันผลของการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* เชื้อดังกล่าวจะถูกนำมายืนยันด้วยการใช้ปฏิกริยาชีวเคมี ในตัวอย่างอาหารและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม (Taylor, 1965; Hoben et al., 1973; Miller et al., 1991) ทั้งนี้อาหารที่ใช้บ่งบอกการปนเปื้อนของ *Salmonella* ที่ใช้ปฏิกริยาการเกิด H_2S production อยู่ในรูปของของแข็ง ดังนั้นในการปรับเปลี่ยนเป็นรูปแบบอาหารเหลวจำเพาะจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาเพื่อให้ได้อาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะกับการบ่งชี้การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella*

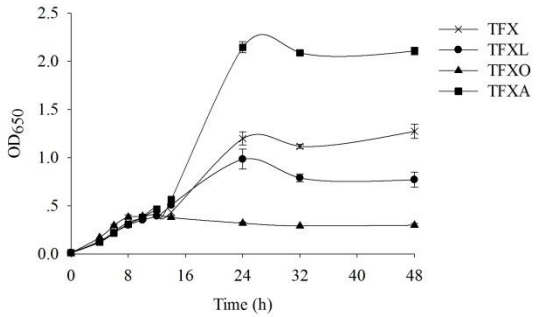
4.6.1 ผลของกรดอะมิโนเดี่ยวของปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นที่มีต่อการเกิด hydrogen sulfide production ใน TFX media

รูปที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง (OD_{650}) โดย *Salmonella* spp. ในอาหารเหลว TFX ที่มีการเติมไลซีน, ออร์นิธิน, หรืออาร์จินิน ในอาหารที่ปรากฏไฮโดรเจนซัลไฟด์เป็น indicator และอาหาร

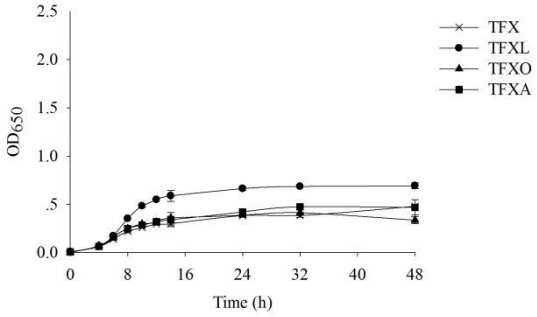
เหลวควบคุมเป็น TFX เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ เช่น *S.* Enteritidis (รูปที่ 4.3A) ในอาหาร TFXO แสดงให้เห็นปริมาณที่มากที่สุดและอัตราการเกิด H_2S production ที่รวดเร็วกว่าอาหารเหลวที่มีไลซีนและอาร์จินินเป็นส่วนผสม ค่าการดูดกลืนแสงต่อเวลาของอาหารเหลว TFX (ไม่มีกรดอะมิโน) ที่ถูกใส่เชื้อด้วย *Salmonella* ในรูปที่ 4.3 ให้ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{650}) ที่น้อยที่สุดของการวัด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวจำเพาะตัวอื่นที่มีการเติมกรดอะมิโน



(A) *S.* Enteritidis



(B) *S.* Anatum



(C) *S.* Typhi

รูปที่ 4.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ทำการวัดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรเทียบกับเวลาของเชื้อ *Salmonellae* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml; (A) *S.* Enteritidis (B) *S.* Anatum และ (C) Typhi, และทำการเติมเชื้อลงในไธโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทบนพื้นฐานของอาหาร TFX ที่มีการ supplemented ด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไปของไลซีน (TFXL), ออร์นิธิน (TFXO), และอาร์จินิน (TFXA) ภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในแต่ละข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM, n = 3.

มีสถานการณ์ที่เชื้อบางตัวเกิดปฏิกริยา H_2S^+ ที่อ่อน เช่น *S.* Anatum และ *S.* Typhi โดยสามารถเกิดปฏิกริยาที่ช้าและมีการตกตะกอนที่อ่อนไม่เข้มและการพัฒนาค่าการดูดกลืนแสงเป็นไปอย่างช้า เชื้อ *S.* Anatum (รูปที่ 4.3B) เกิด H_2S production มากที่สุดในอาหารเหลว TFXA ถึงแม้ว่าโดยทั่วไปใน typical *Salmonella* อัตราของการเกิดปฏิกริยาอาร์จินินดีคาร์บอกซีเลชั่น (ADC) มีความช้าเมื่อเปรียบเทียบกับ ODC และ LDC สำหรับ *S.* Typhi เชื้อดังกล่าวให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} ที่น้อย (ไม่มากกว่า 1.0 OD) ในกรดอะมิโนทุกชนิดที่ทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่นๆ ที่ทำการทดสอบ อย่างไรก็ตามปฏิกริยาไลซีนดีคาร์บอกซีเลชั่นถูกมีประโยชน์สำหรับ *S.* Typhi (รูปที่ 4.3C)

อาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของไลซีนและออร์นิธินพบว่าได้มีการพัฒนาช่วยเพิ่มความสามารถในการคัดเลือกโดยสามารถที่จะคัดเลือกเชื้อ *Citrobacter freundii* ซึ่งสามารถเกิดปฏิกริยาการใช้ H_2S ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ในขณะเดียวกัน อาร์จินินอย่างแน่นอนสามารถที่จะชักนำให้เกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยให้ปฏิกริยาการเกิดที่อ่อนของเชื้อ *S.* Anatum (รูปที่ 4.3) การพิจารณาทั้งความไวและความสามารถในการคัดเลือกของเชื้อ *Salmonella* กรดอะมิโนไลซีน ออร์นิธินและอาร์จินิน แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างได้ตามที่หวัง ดังนั้นเพื่อที่จะครอบคลุมการตรวจวิเคราะห์ของ H_2S production ในทุก *Salmonella* ซีโรวาร์ การใช้กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด (ไลซีน, ออร์นินธิน และอาร์จินิน) ในการผสมทำงานเข้าด้วยกันมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถในการคัดเลือกเชื้อของอาหารไทโอซัลเฟต-เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรทในอาหารเหลว TFX ที่มีการเติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น ไลซีน (L), ออร์นิธิน (O), และอาร์จินิน (A) ที่ใส่เชื้อด้วย *Salmonellae* และที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonellae* ที่ปริมาณเซลล์ 7 log CFU/ml ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C (ให้ผลที่ 24 ชั่วโมงของการบ่ม)

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	การเกิด H_2S จากการรีดักชั่นของไธโอซัลเฟต	อาหารเหลวบ่งชี้			
		TFX	TFXL	TFXO	TFXA
เชื้อ Salmonella					
เชื้อในกลุ่ม Typical serovars					
S. Enteritidis	+	-	+	+	+
S. Rissen	+	-	+	+	+
S. Typhimurium	+	-	+	+	+
S. Weltevreden	+	-	+	+	+
S. Paratyphi B	+	-	+	+	-
เชื้อในกลุ่ม Atypical serovars					
S. Anatum	+	+	+	-	+
S. Typhi	+	-	-	+	-
แบคทีเรียแกรมลบ					
ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella					
Citrobacter freundii	+	+	-	-	+
Proteus mirabilis	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+
Escherichia coli	-	-	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-
Shigella flexneri	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-	-	-
แบคทีเรียแกรมบวก					
ที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella					
Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-

*ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรในอาหารเหลวที่มีการใส่เชื้อโดย blank ของการทดลองเป็นอาหารเหลวที่ไม่มีเชื้อ และอธิบายผล positive H_2S (+) บ่งบอกการเจริญเติบโตของเซลล์ และผล negative H_2S (-) บ่งบอกการไม่เกิด H_2S production. +, OD_{650} ของตัวอย่าง > OD_{650} of the most turbid-H_2S (-) bacterium; -, OD_{650} ของตัวอย่าง $\leq$ OD_{650} of the most turbid-H_2S (-) bacterium.

4.6.2 ผลของน้ำตาลที่สามารถเกิดการ fermentation ของการเกิด hydrogen sulfide production ในอาหาร TFLOA

ในการศึกษาปัจจุบัน คาร์โบไฮเดรตที่สามารถเกิดการ fermentation ของเชื้อ *Salmonella* และที่ไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* โดยเฉพาะเป็นพิเศษเช่นเชื้อ *Citrobacter* และ *Proteus* spp. ถูกนำมาศึกษาเพื่อที่จะหาแหล่งคาร์โบไฮเดรตทางเลือกที่เหมาะสมเพื่อที่จะบ่งบอกการเกิด hydrogen sulfide production ใน *Salmonella* แต่ไม่ปรากฏใน *Citrobacter* และ *Proteus* spp. ดังนั้น 19 คาร์โบไฮเดรตถูกเติมอย่างเดี่ยวๆ ลงในอาหารเหลว TFLOA ซึ่งเป็นอาหารที่ได้มีการคัดเลือกว่าเหมาะสมในการทดลองก่อนหน้านี้ ไธโอซัลเฟต-รีดิวซ์ซิ่ง *Salmonella* และที่ไม่ใช่ *Salmonella* (non-salmonellae) ถูกเพาะบ่มในแต่ละชนิดของเชื้อในแต่ละ well ของแต่ละอาหารที่ใช้ในการทดสอบ และเมื่อนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง อาหารเหลวควบคุมที่เป็น TFLOA ที่เติมไซโลส ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรถูกใช้ในการวัดปริมาณการตกตะกอนของ iron sulfide precipitation.

สำหรับเกณฑ์หรือบรรทัดฐานในการเลือกแหล่งของคาร์บอนเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 650 นาโนเมตรจากเชื้อ *Salmonellae* ที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด โดยเฉพาะเป็นพิเศษเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Typhi ในขณะที่มันยับยั้งการเกิดการตกตะกอนสีดำของเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ท่ามกลางคาร์โบไฮเดรตที่สามารถเกิดการ fermentation ได้ทั้งหมด ดูซิทอล และแมนนิทอล ได้ถูกนำมาใช้ (ตารางที่ 4.8) เชื้อ *S.* Anatum ให้สัญญาณการเกิด H_2S มากที่สุดใน TFLOA ที่มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอลและสัญญาณของ H_2S ของ *S.* Typhi ให้ค่ามากที่สุดโดยการแทนที่ไซโลสด้วยดูซิทอล การใช้ TFLOA ร่วมกับดูซิทอลหรือแมนนิทอลยังฟื้นตัวและ detected การตกตะกอนสีดำด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650}

ตารางที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงของ *Salmonella* ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ของ *Salmonella* ที่ปริมาณเชื้อ 7 log CFU/ml ในอาหารเหลว TFOA ที่มีหรือไม่มีไซโลสหรือทรีฮาโลส (คัดเลือกจากการใช้น้ำตาล 19 ชนิด) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	**อาหาร TFLOA ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาล**			
	-	**ไซโลส**	**ดูซิทอล**	**แมนนิทอล**
S. Anatum	1.536±0.005	1.392±0.003	0.867±0.004	1.740±0.002
S. Typhi	0.265±0.004	0.654±0.004	1.678±0.007	0.789±0.005
S. Enteritidis	0.952±0.004	1.390±0.005	1.499±0.003	1.336±0.003

S. Rissen	0.768±0.006	1.920±0.004	1.921±0.006	1.520±0.004
S. Typhimurium	1.448±0.007	1.801±0.003	1.935±0.003	1.392±0.005
S. Weltevreden	0.838±0.005	1.517±0.002	1.430±0.005	0.882±0.007
S. Paratyphi B	0.864±0.005	1.652±0.005	1.805±0.005	1.084±0.006

ตารางที่ 4.9 แสดงการคัดเลือกเชื้อของอาหารไทโอซัลเฟต-เฟอริก แอมโมเนียมซิเตรทของอาหาร TFLOA ที่มีการเสริมด้วยไซโลส (ตัวอย่างควบคุม), ดูซิทอล, หรือแมนนิทอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการใส่เชื้อ Salmonellae และที่ไม่ใช่เชื้อ Salmonella ปริมาณ 7 log CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และสังเกตด้วยตาที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการบ่ม

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ	**อาหาร TFLOA**		
	ไซโลส	ดูซิทอล	แมนนิทอล
แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซิ่งไธโอซัลเฟต			
Citrobacter freundii	+	-	-
Proteus mirabilis	+	+	+
Proteus vulgaris	+	-	-
แบคทีเรียที่ไม่สามารถรีดิวซิ่งไธโอซัลเฟต			
Enterobacter aerogenes	-	-	-
Escherichia coli	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-
Serratia marcescens	-	-	-
Psuedomonas aeruginosa	-	-	-
Shigella flexneri	-	-	-
Shigella sonnei	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-
แบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่ Salmonella			
Enterococcus faecalis	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-

Staphylococcus aureus	-	-	-

*ผลการทดลองอยู่บนพื้นฐานของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตรในอาหารเหลวที่มีการใส่เชื้อ โดย blank ของการทดลองเป็นอาหารเหลวที่ไม่มีเชื้อ และอธิบายผล positive H_2S (+) บ่งบอกการเจริญเติบโตของเซลล์ และผล negative H_2S (-) บ่งบอกการไม่เกิด H_2S production. +, OD_{650} ของตัวอย่าง > OD_{650} of the most turbid-H_2S (-) bacterium; -, OD_{650} ของตัวอย่าง $\leq$ OD_{650} of the most turbid-H_2S (-) bacterium.

ในอาหารเหลวจำเพาะ, TFLOA ร่วมกับดูซิทอลหรือแมนนิทอล แสดงให้เห็นการพัฒนาอาหารให้มีความสามารถในการคัดเลือกเชื้อโดยสามารถคัดแยกเชื้อเช่น *C. freundii* และ *P. vulgaris* เมื่อเปรียบเทียบกับไซโลสดังแสดงในตารางที่ 4.9

ปฏิกริยาอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นเป็นที่ทราบดีว่าเพื่อป้องกันการ Masking ของการ detection ของ H_2S ในการปรากฏของคาร์โบไฮเดรตที่สามารถเกิดการเฟอร์เมนเตชั่นได้ ซึ่งก่อให้เกิดกรดที่มากในการแทรกแซงการตกตะกอนของ FeS (Barrett และ Clark, 1987; Bulmash และ Fulton, 1964) การทำลายหรือสลายของไธโอซัลเฟตรีดักเตสโดยกลูโคสและคาร์โบไฮเดรตที่สามารถ ferment ได้อื่นๆ ได้ถูกจำลองขึ้นมา

เพื่อลดผลกระทบในทางตรงกันข้ามของอาหารเหลวที่เป็นกรดและปรับปรุงความสามารถการเกิดของไฮโดรเจนซัลไฟด์นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของตะกอนสีดำ กรดอะมิโนอื่นๆ (ออร์นิธิน, อาร์จินิน, และการใช้ร่วมกันของกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิด) ถูกนำมาประเมิน การเปลี่ยนแหล่งของกรดอะมิโนจากไลซีน (TFXL) ไปเป็นออร์นิธิน (TFXO) และเป็นอาร์จินิน (TFXA) ในอาหาร TFX มีผลต่อการเกิด H_2S production และอัตราการเกิดการตกตะกอนสีดำใน *Salmonella* ในเส้นทางที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (รูปที่ 4.3) การเกิดผลบวกของ H_2S ในอาหาร TFXO ถูกยืนยันก่อนหน้านั้นว่าเชื้ออื่นๆ ในเชื้อ *Salmonella* โดยส่วนมากแล้วท่ามกลางกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด (AADC), ODC ถูกรายงานว่าให้อัตราการเกิดปฏิกริยาอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นมากที่สุด (Shelef และ Tan, 1998) ดังนั้นการผลิต production ของอัลคาไลน์เอมีนที่เร็วจากการสนับสนุนของออร์นิธินและเร่งการเกิด H_2S production และต่อมาเกิดการตกตะกอนสีดำใน

อาหารเหลว การไม่เติมกรดอะมิโน อาหารเหลวให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH ลดลงและการเกิด H_2S ถูกแสดงให้เห็น

สำหรับเชื้อบางตัวที่เป็น atypical เช่น เชื้อ *S.* Anatum สามารถที่จะใช้กรดอะมิโนอาร์จินิน ไปเป็น agmatine และ putrescine ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ pH เป็นกลางกว่าที่สภาวะเป็นกรดซึ่งได้ถูกรายงานโดย Goldschmidt และ Lockhart (1971) มันถูกแสดงให้เห็นว่า *S.* Anatum เมื่อเปรียบเทียบกับ *S.* Enteritidis ผลิตกรดได้ช้ากว่าจากการเฟอร์เมนเตชั่นของน้ำตาลไซโลส ดังนั้น อาหารเหลวยังคงมี pH ที่ 7 เป็นที่สังเกตว่ารูปที่ 4.3B อาหารเหลว TFX ที่มี *S.* Anatum ให้ค่า OD_{650} ที่สูงกว่า *S.* Typhi และ *S.* Enteritidis เพราะการเฟอร์เมนเตชั่นที่ช้านำไปสู่ปฏิกริยาของ ADC เพื่อผลิตเอมีนที่มากเพื่อยังคงอาหารเหลวที่ pH เป็นกลาง ปฏิกริยาดีคาร์บอกซีเลชั่นไม่ได้มีความจำเป็นเพื่อกระตุ้น pH ให้สูงขึ้น เพื่อให้เกิด H_2S production ที่ดี เป็นผลให้ *S.* Anatum สร้างการเกิดตะกอนสีดำของในอาหาร TFXA

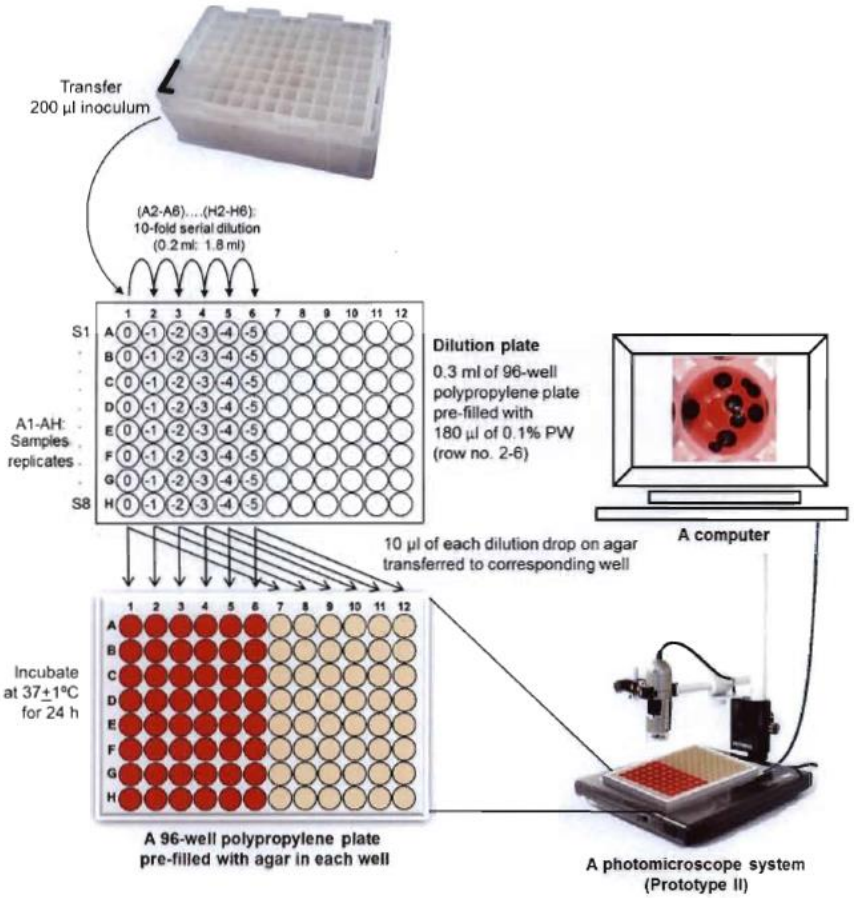
การฟอร์มตัวของกรดเป็นผลมาจากการเฟอร์เมนเตชั่นของคาร์โบไฮเดรตซึ่งอาจจะมีผลกับการเกิด hydrogen sulfide production โดยการไปกดกิจกรรมไธโอซัลเฟตรีดักเตส (Rambach, 1990) มากไปกว่านั้น Veron และ Gasser (1963) ได้รายงานภายใต้เงื่อนไขที่เป็นกรด แบคทีเรียที่ให้ผลเป็นบวกของ H_2S-positive ไม่ก่อให้เกิดตะกอนสีดำของไอรอนซัลไฟด์ น้ำตาลที่สามารถเกิดการ fermentation ได้ที่เหมาะสมในระบบของไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถที่จะพัฒนาความสามารถในการคัดเลือกอาหารสำหรับ *Salmonella* (Park et al., 2012; Shelef และ Tan, 1998) ในส่วนของอาหารเหลว TFLOA ดูซิทอลและแมนนิทอลถูกพบว่ามีความไวกว่าการใช้ไซโลสสำหรับเชื้อ *S.* Typhi และ *S.* Anatum ตามลำดับ มากไปกว่านั้นน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเหล่านี้ขัดขวางเชื้อ *C. freundii* และ *Proteus* spp. เพิ่มการคัดเลือกของอาหารและยังคงมีประสิทธิภาพในการ detect เชื้อ typical Salmonella สายพันธุ์อื่นด้วย การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{650} การเฟอร์เมนต์ของน้ำตาลเหล่านี้ใน *C. freundii* และ *Proteus* spp. ทำให้อาหารเหลวมีความเป็นกรดมากและอาจจะส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการเกิดปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนดีคาร์บอกซีเลชั่นโดยเชื้อเหล่านี้เป็นผลในการเกิดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์และไม่เกิดสีดำของอาหาร Park et al. (2012) ได้รายงานเหมือนกันว่าผลของชนิดของน้ำตาลและความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตสามารถที่จะขัดขวางเชื้อ *C. freundii* และ *P. mirabilis* และประสบผลสำเร็จในการออกแบบ อาหารแข็งจำเพาะที่เป็น XA ด้วยความเข้มข้นของอะราบิโนสที่เหมาะสม

4.7 การตรวจสอบความถูกต้องของการลดขนาดโปรโตคอลโดยการใช้อาหารเหลวจำเพาะ AADC ควบคู่กับการใช้ indicator ที่เป็นอาหารเหลวจำเพาะ H_2S ในตัวอย่างอุตสาหกรรมอาหาร

ผู้วิจัยได้ combined การใช้รูปแบบการวิเคราะห์ขนาดเล็กของอาหารเหลวที่มีการใช้กรดอะมิโน (AADC) และอาหารเหลวบ่งชี้จากปฏิกริยา H_2S เพื่อที่จะจัดหาวิธีการวิเคราะห์การตรวจแบบเร็วของการปนเปื้อน *Salmonella* (RapidSAL) เบื้องต้น การสอบเทียบของโปรโตคอลนี้สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างอุตสาหกรรมถูกนำมาวิเคราะห์ประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการศึกษา วัตถุประสงค์เบื้องต้นของวิธีการวิเคราะห์เพื่อที่จะประยุกต์พัฒนาอาหารเหลวจำเพาะ AADC และอาหาร H_2S จำเพาะในการตรวจความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนเบื้องต้น สำหรับการเพิ่มจำนวนครั้งที่ 2 อย่างไรก็ตามหลังจากสรุปความต้องการในระดับอุตสาหกรรมซึ่งต้องการผลเบื้องต้นอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ดังนั้นพวกเราได้ประยุกต์การใช้อาหารเหลวบ่งบอกการปนเปื้อนเบื้องต้นโดยเป็นอาหารในการเพิ่มจำนวนของเชื้อในขั้นตอนแรก อาหารเปลี่ยนสีเพิ่มจำนวนโดยหลักเป็นการทำงานร่วมกันของอาหารที่อาศัยปฏิกริยา biochemical ของ *Salmonella* ที่เป็น AADC และ H_2S production เพื่อที่จะช่วยในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Salmonella* เบื้องต้น ตัวยับยั้งที่ปริมาณน้อยถูกรวมอยู่ในอาหารดังกล่าวเพื่อที่จะยับยั้งหรือลดเชื้อแข่งขันแต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการฟื้นตัวของเชื้อ *Salmonella* ที่มีปริมาณน้อย ดังนั้นถ้าอาหาร AADC และ H_2S ที่ได้มีการพัฒนาสำหรับเป็นอาหารตรวจวิเคราะห์เชื้อเบื้องต้นให้ผลเป็นลบ นั่นหมายถึงไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในตัวอย่างอาหารที่วิเคราะห์และสามารถถูกรายงานว่าไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* (ND) นี้เป็นวัตถุประสงค์หลักและเป็นการประยุกต์การใช้ของ RapidSAL ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ในการศึกษาพวกเราได้มีการสอบเทียบวิธีการวิเคราะห์ RapidSAL กับมาตรฐาน ISO และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ของอาหารที่ได้มีการพัฒนาสำหรับการเพิ่มจำนวนในตอนแรกของการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารจริงและตัวอย่างที่ได้มีการ swab

สำหรับรูปแบบการวิเคราะห์ RapidSAL (รูปที่ 4.4) ที่มี 3 steps สำหรับการวิเคราะห์ โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่าง โดยตัวอย่างถูกผสมกับอาหารไม่จำเพาะที่เป็น BPW ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นตัวอย่างอาหารถูกปิเปตลงสู่อาหารเหลวบ่งบอกสี 8 ชนิดที่เป็น mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, TFXOA, และ TFTOA ตามลำดับ และเมื่อนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์ การปนเปื้อนเบื้องต้น สามารถให้ผลการอ่านด้วยสายตาภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับการ

ทดลองต่อไปเป็นการใช้อาหารจำเพาะแข็งขนาดเล็กเพื่อที่จะบ่มตัวอย่างเบื้องต้น ทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 10 เท่า และหยดลงบนอาหารแข็งจำเพาะ XLD และอาหารแข็งโครโมเจนิก ABC โดยการใช้เทคนิค MDPT จากนั้นบ่มภายใน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C โคโลนีที่อาจเป็นไปได้ว่าจะเป็น *Salmonella* สามารถถูกตรวจพบได้บนอาหารแข็ง (การทดสอบความเป็นไปได้ว่าจะมีการปนเปื้อนครั้งที่ 2) ไม่เพียงเท่านั้นสำหรับการตีความของ protocol ถ้าผลการทดลองจากตัวอย่างอาหารเหลวที่เป็นไปได้ที่จะเป็น *Salmonella* ให้ผลเป็น negative ในตัวอย่างที่ทำการทดสอบทั้งหมด มันหมายถึงตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการปนเปื้อนที่เป็นบวก แสดงเป็นนัยว่ามีความเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนของ *Salmonella* ผลการทดลองที่เป็นลบจากอาหารเหลวจำเพาะสามารถสรุปตัดสินใจได้ว่าตัวอย่างอาหารมีความปลอดภัยจาก *Salmonella* ดังนั้นเราสามารถที่จะกำจัดขั้นตอนการทดลองต่อไปที่เป็น step การเพาะเลี้ยงตัวอย่างบน agar ประโยชน์คุณลักษณะจำเพาะของอาหารเหลวเพื่อจะสามารถ screening การตรวจตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วสำหรับการไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ที่ให้ negative จากตัวอย่างอาหารเหลวทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* ด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ผลอย่างรวดเร็ว และมีการใช้ปริมาณของอาหารที่น้อย ทำให้สามารถประหยัดค่าใช้จ่าย โดยไม่จำเป็นต้องดำเนินการทดลองในขั้นตอนของ agar ต่อไปเพื่อที่จะยืนยันผลการทดสอบที่เป็น negative นอกจากนี้แล้วเพื่อให้ได้ผลของความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนครั้งที่ 2 เราสามารถใช้อาหารแข็งจำเพาะ XLD และ อาหารโครโมเจนิก ABC agar การทดสอบนี้ให้ความจำเพาะที่สูงกว่าอาหารจำเพาะสีที่เป็นการบ่งบอกความเป็นไปได้ในการปนเปื้อน เพราะมันสามารถที่จะยับยั้งเชื้อแข่งขันได้มาก แบคทีเรียหลายๆ ตัวที่ให้ผลเป็น positive ในอาหารเหลวตรวจการปนเปื้อนเบื้องต้น สามารถที่จะถูกจำแนกจาก *Salmonella* บนอาหารแข็งทั้ง 2 ชนิดเหล่านี้ได้ ในการเปรียบเทียบกับวิธีการ conventional ISO 6579:2002 ซึ่งมี 3 step ในการวิเคราะห์กับ 1 ขั้นตอนของผลการทดลองที่เป็นไปได้จากอาหารแข็งในวันที่ 3



รูปที่ 4.4 ไดอะแกรมแสดงเทคนิค MDPT ที่ประกอบไปด้วยเซ็ทอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ใน 96-well microplate มีการใช้เทคนิคกล้องดิจิตอล microscopic ในการพัฒนาตรวจนับโคโลนีของ *Salmonella* บนอาหารจำเพาะแข็ง

การศึกษานี้เพื่อที่จะประเมินประสิทธิภาพในเทอมของความไวและความจำเพาะของในแต่ละอาหารเหลวสีและการทำงานร่วมกันของอาหารเหลวจำเพาะ และเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ protocol ของ RapidSAL ซึ่งเป็นเทคนิคที่เป็นการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหาร enrichment ที่บ่งบอกสี และหลักจากนั้นทำการ subsequent อาหารดังกล่าวลงบนอาหารแข็งขนาดเล็ก เปรียบเทียบกับโปรโตคอลของวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน ISO โดย PCR สำหรับ *Salmonella* ตัวอย่างอุตสาหกรรมทั้งหมด 14 ตัวอย่าง และตัวอย่าง swab รวมถึงตัวอย่างควบคุมที่เป็น positive (*S.* Enteritidis, 1 log CFU/ml), และตัวอย่างควบคุมที่เป็น negative (*L. monocytogenes*) ถูกใช้สำหรับการปนเปื้อนของ *Salmonella* โดยธรรมชาติโดยการใช้

เทคนิค RapidSAL และเทคนิควิธีการที่เป็นมาตรฐาน conventional ของ ISO 6579:2002 ตัวอย่างอาหารที่เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นสัตว์ปีก และตัวอย่างที่เป็น swab จากอุปกรณ์เครื่องจักรกระบวนการผลิต เช่น ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่, เครื่องตัด, เครื่องควักไส้, เครื่องล้าง, วัตถุดิบไก่สด, และตัวอย่างที่ swab จากทวาร โดยตัวอย่างถูกนำมาจากโรงงานอุตสาหกรรมไก่และตัวอย่างถูกนำมาทดสอบในวันที่มีการเก็บตัวอย่าง โดยทั่วไปการปนเปื้อนของ *Salmonella* เป็นปัญหาหลักที่เป็นอันตรายกับผู้บริโภคในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมจำเป็นต้องการผลวิเคราะห์ที่เร็ว ถูกต้องและราคาไม่สูง มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนที่ไม่พึงปรารถนา ใน protocol ของ RapidSAL (รูปที่ 4.4) ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาผสมกับอาหารเหลวไม่จำเพาะที่เป็น BPW จากนั้นตัวอย่างถูก subsequently ลงในอาหารเหลวจำเพาะสีทั้ง 8 ที่เป็น mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, TFXOA, และ TFTOA และ 2 ชนิดที่เป็นอาหารแข็งคือ XLD และอาหารโครโมเจนิก ABC โดยการใช้เทคนิค MDPT เพื่อที่จะประเมินอาหารเหลวจำเพาะที่เป็นไปได้ การเปลี่ยนสีในแต่ละอาหารเหลวจำเพาะที่ 12 และ 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันโดยการใช้วิธีที่เป็นมาตรฐานของ ISO 6579:2002 ถูกนำมาใช้ซึ่งดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพของโรงงาน ตัวอย่างทั้งหมดหลังขั้นตอนการตรวจสอบการปนเปื้อนเบื้องต้นของวิธีการที่พัฒนาและวิธีการที่เป็นมาตรฐาน ISO ถูกนำมายืนยันการมีอยู่ของ *Salmonella* โดยการใช้ชุดทดสอบท้องตลาดที่ใช้พื้นฐาน PCR ในการวิเคราะห์โดย lab ของทางโรงงาน การยืนยันผลด้วย PCR เพื่อเป็นการอ้างอิงเปรียบเทียบความถูกต้องกับ protocol อีก 2 วิธี

4.8 ความไวและความจำเพาะของอาหารเหลว AADC และอาหารจำเพาะ H_2S เพื่อวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการปนเปื้อน

ความไวและความจำเพาะของอาหารเหลวบ่งบอกด้วยสีทั้ง 8 อาหาร เช่น mLDB-PR, LRVS, LMC, mODB-PR, ORVS, OMC, TFXOA, และ TFTOA ที่ enrichment เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ถูกนำมาวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.10 และ 4.11, ตามลำดับ) เปรียบเทียบผลทดสอบกับเทคนิค PCR (ตารางที่ 4.10 และ 4.11) ทั้ง 8 อาหารเหลวจำเพาะที่มีการ enrichment เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ให้ผลที่ไม่เป็น false negative ความหมายคือ ทั้ง 8 อาหารไม่ได้ให้ผลการทดสอบที่เป็นลบ แต่ความเป็นจริงมีการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งเป็นผลการทดลองที่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ผลการทดลองจากการอ่านค่าการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวสี

ในอาหารเหลวจำเพาะทั้ง 8 ที่ทำงานร่วมกันให้ผลวิเคราะห์ที่เป็น positive และ negative ในตัวอย่างของทั้ง 12 และ 24 ชั่วโมง โดยให้ค่า sensitivity = 100% และ selectivity = 25% ถึงแม้ว่าค่า selectivity ที่ได้ของอาหารทั้ง 8 ให้ค่าค่อนข้างต่ำ มันไม่ได้เป็นปัญหา เพราะว่าอาหารแข็งจำเพาะและอาหารโครโมเจนิกของการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* สามารถที่จะกดหรือยับยั้งเชื้อแข่งขันโดยส่วนใหญ่ได้ วิธีการวิเคราะห์แบบ conventional ของ XLD ควบคู่กับการใช้ agar ที่เป็นโครโมเจนิก ABC สามารถที่จะจำแนกแยกเชื้อ *Salmonella* ซีโรไทด์ (ยกเว้นซีโรวาร์บางตัว) ในขณะที่มันยับยั้งเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* ได้หลายตัว โดยเฉพาะเป็นพิเศษ strain ที่มีความใกล้เคียงกับ *Salmonella* เช่น *Shigella*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Proteus* (Perry et al., 1999; Mooijman, 2012) มากไปกว่านั้น วัตถุประสงค์ของอาหารเหลว presumptive ได้มีการพัฒนา sensitivity ซึ่งเป็นปัจจัยที่ critical เพื่อที่จะแก้ปัญหาหลักของอาหารของ media ที่เป็น selective enrichment ในปัจจุบัน (Bolton, 1998)

ในแต่ละ medium ให้ 100% sensitivity ที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ของการ enrichment ได้ผลเป็นไปตามเป้าหมาย การเพิ่มเวลาการบ่มจาก 12 ไปเป็น 24 ชั่วโมง ลดความสามารถในการ selectivity ของอาหารบางชนิด เช่น mODB-PR, OMC, TFXOA, และ TFTOA โดย False positive มาจากเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* สามารถใช้ออร์นิธินดีคาร์บอกซีเลชั่นและไธโอซัลเฟตได้เช่นเดียวกัน และไม่ถูกยับยั้งโดยแมกนีเซียมคลอไรด์ (OMC media)

False positive คือการให้ผลเป็นบวกแต่จริงๆ ไม่มีการปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกันบนอาหาร selective agar (mODB-PR, TFXOA, และ TFTOA) แบคทีเรียหลายตัวสามารถใช้ไธโอซัลเฟตได้เช่นกัน ดังนั้นปราศจากการเติมตัวยับยั้ง อาหาร TFXOA และ TFTOA ให้ผลวิเคราะห์ที่เป็นบวก แต่ความเป็นจริงไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อเป็นจำนวนมาก หรือให้ผล selectivity ที่น้อย ที่การบ่ม 12 ชั่วโมง (27% และ 35% ตามลำดับ) และที่การบ่ม 24 ชั่วโมง (20% และ 27% ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับอาหาร media อื่นๆ นอกเหนือจากนั้น ผล selectivity ยังขึ้นกับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสำหรับการทดสอบอาหารเหลวจำเพาะเหล่านี้ protocol ของการวิเคราะห์ที่ได้มีการพัฒนาเบื้องต้น ได้มีการออกแบบเพื่อที่จะคัดแยกผลตัวอย่างที่เป็น negative ในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของปริมาณเชื้อน้อย และแบคทีเรียที่มีความหลากหลายโดยปกติไม่มี *Salmonella* อย่างไรก็ตามด้วยข้อจำกัดของตัวอย่างที่เลือกมาใช้ทดสอบในโรงงาน บางตัวอย่างเช่น วัสดุวัตถุดิบและตัวอย่างที่เก็บจากสิ่งแวดล้อมเต็มไปด้วยแบคทีเรียจำนวนมาก ดังนั้นผล false positive

จำนวนมากที่แสดงให้เห็นในบางตัวอย่างอาหารเหลว โดยเฉพาะเป็นพิเศษกับสูตรที่ไม่มีการเติมตัวยับยั้ง และอย่างสุดท้ายผลตัวอย่างของอาหารเหลวทั้ง 8 ชนิดที่ทำงานร่วมกันแสดงให้เห็นค่า selectivity ต่ำที่ 25% ด้วยเหมือนกัน (ตารางที่ 4.10 และ 4.11) การ enrichment ตัวอย่างเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ selectivity ที่สูงกว่าที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ sensitivity ยังคงมีค่าสูงที่ 100% ใช้เวลา enrichment 24 ชั่วโมง ไม่เหมือนกับอาหาร media ของมาตรฐานอื่น ที่อาหารเหลวต้องการเวลาการบ่มที่นานสำหรับเพื่อให้ได้เซลล์เป้าหมายถึงระดับจำนวนที่สามารถปรากฏในอาหารเหลวที่มีสารยับยั้ง ผลจากการทดลองของอาหารเหลวทั้ง 8 อาหารที่ทำงานร่วมกันสามารถที่จะตัดสินใจได้อย่างมั่นใจในการยอมรับของตัวอย่างทั้ง 3 ที่ทำการทดสอบ (ตัวอย่างที่เก็บจากเครื่องล้าง, ไก่ดิบ 2 ตัวอย่าง) ตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลเป็น negative (คือไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella*) ในเวลาอันสั้น 12 – 24 ชั่วโมง กว่าการใช้วิธีที่เป็นมาตรฐานที่ใช้เวลา 72 ชั่วโมง การใช้อาหาร media หลายชนิด มากถึง 8 สูตรอาหาร ทำให้เป็นการวิเคราะห์มีความยุ่งยาก ดังนั้นมันควรที่จะเป็นวิธีที่น่าพอใจ เพื่อเลือก 1 ทางเลือกจากใน 3 กิจกรรม (LDC, ODC, และการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์) จำนวนของตัวอย่างที่มากควรที่จะประเมินด้วยอาหารเหลวจำเพาะทั้ง 8 เพื่อที่จะช่วยเป็นทางเลือก

ตารางที่ 4.10 ผลของอาหารเดี่ยวและผลรวมการใช้อาหารทั้ง 8 presumptive ที่บ่งบอกการเปลี่ยนสีในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. เป็นการตัดสินใจด้วยสายตาในตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างจากกระบวนการผลิตและตัวอย่างควบคุมที่ 12 ชั่วโมงของการเพิ่มจำนวนเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างอ้างอิงที่ได้จากการทดสอบด้วย PCR

No.	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	อาหารเหลวบ่งชี้สีเบื้องต้น								ผลสรุปจากการทดสอบด้วยอาหารเหลวบ่งชี้สีเบื้องต้น	ผลการทดลองที่ถูกต้อง (PCR)
		1	2	3	4	5	6	7	8		
1	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (1)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (2)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3	เคื่องตัด (1)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
4	เครื่องควักไส้ (1)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
5	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (3)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
6	เครื่องควักไส้ (2)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (4)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
8	เครื่องตัด (2)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
9	เครื่องล้าง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	ไก่สด 1	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
11	ไก่สด 2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	ไก่สด 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	ไก่สด 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	บริเวณช่องทวาร	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
15	*Salmonella* Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	*Listeria monocytogenes*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	จำนวนผลที่เป็นบวก	1	1	1	1	1	2	12	11	12	1
	จำนวนผลที่เป็นลบ	15	15	15	15	15	14	4	5	4	15
	จำนวนผลเป็นลบแต่จริงๆมีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	จำนวนผลเป็นบวกแต่จริงๆไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0	0	1	0	1	11	10	11	
	ความไว	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
	ความจำเพาะ	100%	100%	100%	93%	100%	93%	27%	33%	25%	

ตารางที่ 4.11 ผลของอาหารเดี่ยวและผลรวมการใช้อาหารทั้ง 8 presumptive ที่บ่งบอกการเปลี่ยนสีในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. เป็นการตัดสินใจด้วยสายตาในตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างจากกระบวนการผลิตและตัวอย่างควบคุมที่ 24 ชั่วโมงของการเพิ่มจำนวนเปรียบเทียบกับผลของตัวอย่างอ้างอิงที่ได้จากการทดสอบด้วย PCR

No.	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	อาหารเหลวบ่งชี้สีเบื้องต้น								ผลสรุปจากการทดสอบด้วยอาหารเหลวบ่งชี้สีเบื้องต้น	ผลการทดลองที่ถูกต้อง(PCR)
		1	2	3	4	5	6	7	8		
1	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (1)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (2)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3	เครื่องตัด (1)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
4	เครื่องควักไส้ (1)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
5	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (3)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
6	เครื่องควักไส้ (2)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
7	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (4)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
8	เครื่องตัด (2)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
9	เครื่องล้าง	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	ไก่สด 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
11	ไก่สด 2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
12	ไก่สด 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	ไก่สด 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	บริเวณช่องทวาร	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
15	*Salmonella* Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	*Listeria monocytogenes*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	จำนวนผลที่เป็นบวก	1	1	1	2	1	4	13	12	12	1
	จำนวนผลที่เป็นลบ	15	15	15	14	15	12	3	4	4	15
	จำนวนผลเป็นลบแต่จริงๆมีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	จำนวนผลเป็นบวกแต่จริงๆไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0	0	1	0	3	12	11	11	
	ความไว	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
	ความจำเพาะ	100%	100%	100%	93%	100%	80%	20%	27%	25%	

4.9 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีของ RapidSAL และวิธี ISO method

จำนวนทั้งหมดของ *Salmonella* ที่ให้ผลเป็น negative และ positive ถูกพบว่าเป็น 15 (94%) และ 1 (5%) ตามลำดับ ตัวอย่างทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ตรวจพบโดยวิธี RapidSAL และ ISO method และยืนยันผลด้วยวิธี PCR assay kit (ตารางที่ 4.12) ผลการทดลองที่ตัวอย่างมีการปนเปื้อนโดยธรรมชาติและตัวอย่างที่มีการ inoculation ของเชื้อ โดยทั้ง 2 วิธีที่ทำการตรวจวิเคราะห์แสดงให้เห็นมีความสอดคล้องกันระหว่างทั้ง 2 วิธี ที่มีการใช้ 2×2 configuration ดังนั้น โปรโตคอลของ RapidSAL มีความถูกต้องมากสอดคล้องกับวิธีการของ ISO method (Cohan KAPPA, $\kappa = 1$)

ตารางที่ 4.12 ผลการทดลองการยืนยันเชื้อ *Salmonella* โดยการใช้เทคนิค RapidSAL เปรียบเทียบกับ ISO protocol ในตัวอย่างอุตสาหกรรม 14 ตัวอย่าง RapidSAL ถูกประกอบไปด้วยการ presumptive enrichment ใน 8 อาหารเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ subsequently ลงบนอาหารแข็ง XLD และ ABC ที่บรรจุอยู่ใน 96-well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 24 ชั่วโมง โปรโตคอล ISO ใช้ในขั้นตอน non-selective enrichment (24 ชั่วโมง), ขั้นตอนการคัดเลือกจำเพาะ (24 ชั่วโมง) และ selective plating (24 ชั่วโมง)

No.	ตัวอย่าง	RapidSAL	ISO
1	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (1)	-	-
2	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (2)	-	-
3	เคื่องตัด (1)	-	-
4	เครื่องควักไส้ (1)	-	-
5	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (3)	-	-
6	เครื่องควักไส้ (2)	-	-
7	ลูกกลิ้งสายพานลำเลียงไก่ (4)	-	-
8	เครื่องตัด (2)	-	-
9	เครื่องล้าง	-	-
10	ไก่สด 1	-	-
11	ไก่สด 2	-	-
12	ไก่สด 3	-	-
13	ไก่สด 4	-	-
14	บริเวณช่องทวาร	-	-

Positive control	*Salmonella* Enteritidis	+	+
Negative control	*Listeria monocytogenes*	-	-
	จำนวนผลที่เป็นบวก	1	1
	จำนวนผลที่เป็นลบ	15	15
	จำนวนผลเป็นลบแต่จริงๆมีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0
	จำนวนผลเป็นบวกแต่จริงๆไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ	0	0

วิธีที่เป็นทางเลือกโปรโตคอล RapidSAL แสดงให้เห็นแนวโน้มความเป็นไปได้สำหรับวิธีที่ให้ผลวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว: 1 วันในขั้นตอน (first presumptive result); 2 วัน (second presumptive result); และใช้เวลา 3-4 วัน (PCR-confirmation) ในทางตรงกันข้ามกับวิธีที่เป็น conventional method ซึ่งต้องการ 3 วัน (เพียง 1 presumptive result) ด้วยมากกว่า 2 วันเพื่อยืนยันผลการทดลอง มากไปกว่านั้นไม่เคยให้ผลที่เป็น false negative คือให้ผลเป็นลบแต่จริงๆแล้ว มีการติดเชื้อของตัวอย่าง การศึกษานี้เป็นเพียงผลการทดลองเบื้องต้นสำหรับการสอบเทียบวิธีการตรวจที่ถูกต้องโดยพื้นฐาน

ถ้าโปรโตคอล RapidSAL นี้ถูกเลือกสำหรับการนำไปรับรองอย่างเป็นทางการเพื่อเป็นทางเลือกของวิธีการวิเคราะห์ในระดับ in-house การสอบเทียบความถูกต้องควรที่จะประเมินต่อไปตามวิธีของมาตรฐาน standard ISO 16140:2003 (ISO, 2003) ซึ่งประกอบด้วย 2 เฟส อันแรกเปรียบเทียบกับวิธีที่เป็นทางเลือก RapidSAL เปรียบเทียบกับวิธีที่เป็นอ้างอิง และ 2 เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับในแต่ละวิธีของทั้ง 2 วิธี ใน step แรก มาตรฐาน ISO 16140:2003 การทดสอบการสอบเทียบดำเนินตามพารามิเตอร์ข้อจำกัดของการวิเคราะห์ (LOD), ความถูกต้องสัมพันธ์, ความจำเพาะความสัมพันธ์, และความไวสัมพันธ์, ระดับที่สามารถตรวจพบได้ (RDL) และการครอบคลุมและการจำเพาะ ยกเว้นสำหรับ LOD, การครอบคลุมและการจำเพาะ สำหรับ step อื่นๆ ถูกดำเนินการเปรียบเทียบกับวิธีที่เป็นอ้างอิง (ISO 10272:2006) ที่อย่างน้อย 5 อาหาร (food matrices)ที่สัมพันธ์กันถูกเลือกจาก NordVAL matrix –lists สำหรับในแต่ละ matrix ที่อย่างน้อย 60 ตัวอย่าง ถูกวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลที่เป็น positive โดยประมาณเป็น 30 และผลที่เป็น 30

negative โดยวิธีที่เป็นมาตรฐานอ้างอิง ในแต่ละตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดยวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นวิธีอ้างอิง และโดยวิธีที่เป็นทางเลือก

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเหลวบ่งชี้จำเพาะเป็นการวิเคราะห์ผลกระทบในทางลบของผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการฟื้นตัวหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ถึงแม้ว่าอาหารมาตรฐานเหลวบ่งชี้จำเพาะได้ถูกออกแบบมาเพื่อการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแข่งขันอื่นๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและ Enterobacteriaceae บางตัว ผลของสารยับยั้งในอาหารมาตรฐานจำเพาะที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* spp. อาจจะฆ่าเชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์บางตัวที่ให้ผลเป็น false negative คือให้ผลเป็นลบแต่จริงๆ มีการปนเปื้อนของเชื้อ อาหารเหลว MKTTn และ SC มีตัวยับยั้งที่มีความแรงมาก อาจจะมีผลกับเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์ RVS ซึ่งเป็นอาหารเหลวทางการค้าโดยส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพความไวที่สูงมากที่สุด ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* ทั้งใน typical และ atypical ของเชื้อที่ปริมาณ 1-2 log CFU/ml การใช้กิจกรรมของเชื้อที่มีความจำเพาะเช่น อะมิโนเอซิดดีคาร์บอกซีเลชั่นและการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์โปรดักชั่น เพื่อที่จะตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนได้ถูกศึกษาและใช้ให้เหมาะสมในตัวอย่างที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์และตัวอย่างอาหาร การทำให้เพิ่มจำนวนในอาหารเหลวปฏิกริยาการใช้กรดอะมิโนที่ดำเนินการควบคู่กับอาหารเหลวการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถที่จะตรวจวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* อาหารเหลว AADC ที่ได้มีการพัฒนาถูกพัฒนาไปเป็น 7 สูตรและมีประสิทธิภาพที่ดีในการคัดเลือกการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อดังกล่าวและในตัวอย่างอาหาร โดยการสังเกตด้วยตาและใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรด้วยความไวที่สูง การวิเคราะห์ตรวจสอบโดยการใช้ไมโครเพลทสามารถที่จะถูกนำมาใช้กับหลายชนิดของอาหารโดยปราศจากสิ่งรบกวนของความขุ่น ความไวและความจำเพาะของอาหารเหลวไฮโดรเจนซัลไฟด์ของไธโอซัลเฟตรีดิวซิ่งถูกพัฒนาโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลือกใช้กรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่สามารถเกิดการเฟอร์เมนเตชั่นได้ *S.* Typhi และ *S.* Anatum ซึ่งปกติให้อัตราการเกิดไธโอซัลเฟตรีดักชั่นที่น้อย ในงานวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจนสามารถให้การตกตะกอนสีดำที่มากในการพัฒนาเป็นอาหารเหลว โดยสูตรอาหารเหลวที่มีประสิทธิภาพของอาหารเหลว H_2S ถูกแปรเปลี่ยนสำหรับ 2 ชนิดคือ TFTOA และ TFXOA (ไธโอซัลเฟต, เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรท, ออร์นิธิน, และอาร์จินินร่วมกับทรีฮาโลสหรือไซโลส ตามลำดับ) TFTOA มี

ประสิทธิภาพในการเพิ่มการตกตะกอนสีดำและให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 สูง (OD_{650}) ของ *S.* Typhi และ *S.* Anatum และแสดงความไวที่ดีสำหรับเชื้อ *Salmonella* อื่นที่สามารถใช้ไธโอซัลเฟต-รีดิวซิ่งได้ ในขณะที่อาหารเหลว TFXOA ภายใน 24 ชั่วโมง ให้ผลที่มีความไวที่สูงสำหรับเชื้อ typical *Salmonella* แต่น้อยสำหรับ *S.* Typhi และ *S.* Anatum วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยการวัดที่ wavelength 650 นาโนเมตร เพื่อวัดการตกตะกอนสีดำของ iron sulfide ในไมโครเวลมีความประสบความสำเร็จใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับอาหารเหลวในการทดสอบกับเชื้อบริสุทธิ์ แต่ไม่ได้ประยุกต์ใช้กับตัวอย่างอาหารเนื่องจากมีสิ่งรบกวนที่มากเกินไปจากชิ้นส่วนของอาหาร

อาหารเหลวเพิ่มจำนวนบ่งบอกสีใหม่และอาหารแข็งในระดับสเกลเล็กได้มีการสอบเทียบความถูกต้องกับตัวอย่างอาหาร อาหารเหลวเพิ่มจำนวนจำเพาะและอาหารแข็งใช้อาหารมาตรฐานทั่วไปเป็นการสอบเทียบในเชื้อบริสุทธิ์และในตัวอย่างอาหาร การสอบเทียบครั้งที่ 2 ได้ถูกแนะนำโปรโตคอล RapidSAL อาหารเหลวบ่งบอกสี AADC และ H_2S และอาหารแข็งขนาดเล็ก การตรวจสอบความถูกต้องกับตัวอย่างอาหารถูกเปรียบเทียบกับมาตรฐาน ISO 6579:2002 สำหรับการตรวจเช็ค *Salmonella* การใช้โปรโตคอล RapidSAL ขนาดเล็กเป็นทางเลือกแสดงให้เห็นผลเหมือนกันกับวิธีมาตรฐาน ISO ด้วยค่า Cohen Kappa ที่สูง วิธีของโปรโตคอล RapidSAL ให้ผลที่เร็ว: 1 วัน (ผลครั้งแรก); 2 วัน (ผลครั้งที่สอง); และ 3 – 4 วัน (การยืนยันด้วย PCR) ในขณะที่วิธีการวิเคราะห์โดยทั่วไปต้องการ 3 วัน (เพียง 1 วันสำหรับ presumptive result) มากกว่า 2 วันเพื่อยืนยันผลการทดลอง ประโยชน์ของวิธีเหล่านี้จะไม่เป็นอันตรายกับตัวอย่างที่จะให้ผล false negative

วิธีการที่นำเสนอ RapidSAL มีประสิทธิภาพสำหรับการคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ISO ประโยชน์หลักจาก 3 ผลที่อ่านเป็นลบจากอาหารเหลวเพิ่มจำนวนทั้งหมดร่วมกับ step แรก (วันแรก) ของโปรโตคอล หมายถึงมีการยืนยันผลลบ เมื่อมีเพียงผลที่ให้ผลเป็นลบใน step แรก มันสามารถที่จะบ่งบอกได้ว่าตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* การทดสอบต่อไปไม่จำเป็นต้องดำเนินการเนื่องจากเพื่อลดเวลาการวิเคราะห์ลงได้ นอกเหนือจากนั้นโคโลนีที่เป็นบวกจำเป็นต้องการอาหารแข็งขนาดเล็ก ซึ่งผลที่ให้ลบสอดคล้องดีกับวิธี ISO ด้วยการวิเคราะห์ที่รวดเร็วภายใน 1 วัน อย่างในที่สุด PCR kit ถูกใช้ในการยืนยันผลการทดสอบจากทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพสามารถใช้แทนกันได้

เอกสารอ้างอิง

1. ASTVผู้จัดการออนไลน์, 2555, สสจ.เชียงใหม่ฟันธง “ไข่ต้มมีเชื้อซัลโมเนลลา” ต้นเหตุนักเรียนศึกษาสงเคราะห์ป่วยระนาว, ค้นเมื่อ 8 กันยายน2555,จาก http://www.manager.co.th/Local/ViewNews.aspx?NewsID=9550000084946
2. กรุงเทพธุรกิจออนไลน์, 2555, พบเชื้อซัลโมเนลลาระบาดเอี่ยวซูชิทูน่า, ค้นเมื่อ 8 กันยายน 2555, จาก http://www.bangkokbiznews.com/home/detail/politics/world/20120415/446828/พบเชื้อซัลโมเนลลาระบาดเอี่ยวซูชิทูน่า.html
3. อรุณบ่างตระกูลนนท์, สุมณฑาวัฒนสินธุ์และชัยวัฒน์พูลศรีกาญจน์, 2555, โรคซัลโมเนลโลซิส (*Salmonellosis*), ค้นเมื่อ 9 กันยายน 2555, จาก http://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=ลักษณะSalmonellawebdb.dmsc.moph.go.th
4. Anon, 2003, Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne Listeria monocytogenes among selected categories of ready-to-eat foods, FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, USDA/Food Safety and Inspection Service, Centers for Disease Control and Prevention, September 2003.
5. Bailey, J. S., & Cox, N. A. (1992). Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of Salmonella and Listeria in foods. Journal of Food Protection, 55(4), 256-259.
6. Barrett, E. L. and Clark, M. A. 1987. Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. Microbiological Reviews. 51(2): 192-205.
7. Baylis, C. L., MacPhee, S., & Betts, R. P. (2000). Comparison of two commercial preparations of buffered peptone water for the recovery and growth of Salmonella bacteria from foods. Journal of Applied Microbiology, 89(3), 501-510.
8. Begley, M., Gahan, C. G., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiology Reviews, 29(4), 625-651.
9. Blackburn, C.W. and McClure, P.J. (Eds.), 2002, “*Salmonella*”, In Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control, Woodhead, Cambridge, pp. 307-327.
10. Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F., & Colin, P. (1997). Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of Salmonella spp. from poultry products. International Journal of Food Microbiology, 38(2e3), 211-216.

11. Bolton, F.J., 1998, “Strategies in the Development of Media for the Detection of Food Borne Pathogens,” International Journal of Food Microbilogy, Vol. 45, No. 1, pp. 29-34.

12. Bulmash, J. M. and Fulton, M. 1964. Discrepant tests for hydrogen sulfide. Journal of Bacteriology. 88(6): 1813.

13. Busse, M. (1995). Media for Salmonella. International Journal of Food Microbiology, 26(1), 117-131.

14. CDC., 2007, Salmonella *Surveillance: Annual Summary, 2005*. Atlanta, Georgia: USDepartment of Health and Human Services.

15. Chen, H., Fraser, A. D. E., & Yamazaki, H. (1993). Evaluation of the toxicity of Salmonella select media for shortening the enrichment period. International Journal of Food Microbiology, 18(2), 151-159.

16. Christine Stomes, 2010, *Salmonella* outbreak egg recall FAQ frying your mind.[Online], Available: http://www.knowabouthealth.com/salmonella-outbreak-egg-recallfaq-frying-your-mind/5718/ [2010, September 16].

17. Cudjoe, K. S., Krona, R., & Olsen, E. (1994). IMS: a new selective enrichment technique for detection of Salmonella in foods. International Journal of Food Microbiology, 23(2), 159-165.

18. D'Aoust, J. Y., Sewell, A. M., & Warburton, D. W. (1992). A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne Salmonella. International Journal of Food Microbiology, 16(1), 41-50.

19. de Boer, E. (1998). Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. International Journal of Food Microbiology, 45(1), 43-53.

20. Doyle, M.P. (Ed.), 2001, “*Salmonella*” In Foodborne Bacteria Pathogens, Marcel Decker Inc, New York, pp. 384-386.

21. Ewing, W. H. (1986). Biochemical identification of Salmonella. In Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae (4th ed., p. 187). Elsevier Science Publishing Co., Inc.

22. Favrin, S.J., Jassim, S.A. and Griffiths, M.W., 2003, "Application of a Novel Immunomagnetic Separation-Bacteriophage Assay for the Detection of Salmonella enteritidis and Escherichia coli 0157:H7 in Food", International Journal of Food microbiology, Vol. 85, pp. 63-71.

23. Falkow, S. (1958). Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of Salmonellae and Shigellae. Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists, 28(5), 106-108.

24. Goldschmidt, M. C. and Lockhart, B. M. 1971. Rapid methods for determining decarboxylase activity: arginine decarboxylase. Applied Microbiology. 22(3): 350-357.

25. Hammack, T. S., Amaguana, R. M., Johnson, M. L., & Andrews, W. H. (2003). Effectiveness of universal pre-enrichment broth for recovery of Salmonella from selected dairy foods. Journal of AOAC International, 86(4), 714-718.

26. Hobben, D.A., Ashton, D.H. and Peterson, A.C., 1973, "Some observation on the incorporation of novobiocin into Hektoen Enteric Agar for improved Salmonella isolation," Applied Microbiology, Vol. 26, No. 1, pp. 126 - 127

27. ISO. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs e Horizontal method for the detection of Salmonella spp. Geneva: International Organization for Standardization.

28. Jay, J. M. (Ed.), 2000, "Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and Shigella"In Modern Food Microbiology, 6th ed., Aspen publication, Gaithersburg, MDU, p.513.

29. Jenikova, G., Pazlarova, J. and Demnerova, K., Detection of *Salmonella* in Food Samples by the Combination of Immunomagnetic Separation and PCR Assay, Internatl. Microbiol., Vol. 3, pp. 225 – 229, 2000

30. Jiang, J., Larkin, C., Steele, M., Poppe, C., & Odumeru, J. A. (1998). Evaluation of universal preenrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. Journal of Dairy Science, 81(11), 2798-2803.

31. June, G. A., Sherrod, P. S., Hammack, T. S., Amaguana, R. M., & Andrews,W. H. (1995). Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of Salmonella from raw flesh and other highly contaminated foods: precollaborative study. Journal of AOAC

International, 78(2), 375-380.

32. Kauffmann, F. (1930). Ein kombiniertes anreicherungsverfahren fur typhus und paratyphusbacillen. Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung I: medizinisch-hygienische, bakteriologie, virusforschung und parasitologie, originale, 113, 148.

33. Khueankhancharoen, J., & Thipayarat, A. (2014). Development of selective lysine decarboxylase broth using spectrophotometric assay for Salmonella screening. In The 2nd International Conference on Agriculture and Agro-industry 2014 (ICAAI 2014) Fresh Produce, Novel Process and Health Product (pp. 81). Chiangrai, Thailand.

34. Leifson, E. (1939). New selenite selective enrichment medium for the isolation of typhoid and paratyphoid bacilli. American Journal of Hygiene, 24, 423-432.

35. Maijala, R., Johansson, T., & Hirn, J. (1992). Growth of Salmonella and competing flora in five commercial Rappaport-Vassiliadis (RV)-media. International Journal of Food Microbiology, 17(1), 1-8.

36. Matthew P. Johnson, Larisa M. Haupt and Lyn R., 2004, “Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using realtime PCR”, Genomics Research Centre, School of Health Science, Australia. Michael A., 1999, "S-shaped growth curve." A Dictionary of Zoology [Online], Available: http://www.encyclopedia.com/ [2010, October 19].

37. McLaughlin, M. R. (2007). Simple colorimetric microplate test of phage lysis in Salmonella enterica. Journal of Microbiological Methods, 69(2), 394-398.

38. Miller, R.G., Tate, C.R., Mallinson, E.T. and Scherrer, J.A., 1991, “Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*,” Poultry Science, Vol. 70, No. 12, pp. 2429 – 2432.

39. Moeller, V. (1955). Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 36(2), 158-172.

40. Mooijman, K.A., 2012, “Chapter 13 Culture Media for the Isolation of *Salmonella*,” In Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology, RSC Publishing.

41. Müller, L. (1923). Un Nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comptes Rendus des S_eances et M_emoires de la Soci_et_e de Biologie, 89, 434.

42. North, W. R., & Bartram, M. T. (1953). The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella. Applied Microbiology, 1(3), 130-134.

43. Park, S. H., Ryu, S. and Kang, D. H. 2012. Development of an improved selective and differential medium for isolation of *Salmonella* spp. Journal of Clinical Microbiology. 50(10): 3222-3226.

44. Peng, H., & Shelef, L. A. (2001). Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and salmonellae in foods. International Journal of Food Microbiology, 63(3), 225-233.

45. Perry, J.D., Ford, M., Taylor, J., Jones, A.L., Freeman, R. and Gould, F.K., 1999, “ABC Medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp.,” Journal of Chinical Microbilogy, Vol. 37, No. 3, pp. 766-768.

46. Rappaport, F., Konforti, N., & Navon, B. (1956). A new enrichment medium for certain salmonellae. Journal of Clinical Pathology, 9(3), 261-266.

47. Rappaport, F., & Konforti, N. (1959). Selective enrichment medium for paratyphoid bacteria; inhibitory and growth promoting factors. Applied Microbiology, 7(2), 63-66.

48. Restaino, L., Grauman, G. S., McCall, W. A., & Hill, W. M. (1977). Effects of varying concentrations of novobiocin incorporated into two Salmonella plating media on the recovery of four enterobacteriaceae. Applied and Environmental Microbiology, 33(3), 585-589.

49. R. G. Rutledge, 2004, “Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications”,Natural Resources Canada.

50. Ryan, K.J. and Ray, C.G., 2004, “Enterobacteriaceae”, In Medical Microbiology; an Introduction to Infectious Diseases, 4th ed., McGraw-Hill, Boston, pp. 363-367.

51. Sch€onenbrücher, V., Mallinson, E. T., & Bulte, M. (2008). A comparison of standard

cultural methods for the detection of foodborne Salmonella species including three new chromogenic plating media. International Journal of Food Microbiology, 123(1e2), 61-66.

52. Shelef, L.A. and Firstenberg-Eden, R., 1997, Novel selective and non-selective optical detection of microorganism, Letters in Applied Microbiology, Vol. 25, pp. 202-206.

53. Shelef, L.A., Surtani, A., Kanagapandian K. and Tan W., 1998, Automated detection of amino acid decarboxylation in salmonellae and other Enterobacteriaceae, Food Microbiology, Vol. 15, pp. 199-205.

54. Shelef, L. A. and Tan, W. 1998. Automated detection of hydrogen sulfide release from thiosulfate by *Salmonella* spp. Journal of Food Protection. 61(5): 620-622.

55. Shibata, K., Benson, A. A., & Calvin, M. (1954). The absorption spectra of suspensions of living micro-organisms. Biochimica et Biophysica Acta, 15(4), 461-470.

56. Taskila, S., Tuomola, M., Ojamo, H., 2012, Enrichmentcultivationin detection of food-borne *Salmonella*, Food Control, Vol. 26, pp. 369-377.

57. Taylor, W. I. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. American Journal of Clinical Pathology. 44(4): 471-475.

58. van Schothorst, M., & Renaud, A. M. (1983). Dynamics of Salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R10). Journal of Applied Bacteriology, 54(2), 209e215.

59. van Schothorst, M., & Renaud, A. M. (1985). Malachite green pre-enrichment medium for improved Salmonella isolation from heavily contaminated samples. Journal of Applied Bacteriology, 59(3), 223-230.

60. van Schothorst, M., Renaud, A., & van Beek, C. (1987). Salmonella isolation using RVS broth and MLCB agar. Food Microbiology, 4(1), 11-18.

61. Veron, M. and Gasser, F. 1963. Sur la detection de l'hydrogene sulfure produit par certains enterobacteriacees dans les milieux dits de diagnostic rapide. Ann Inst Pasteur (Paris). 105: 524–534.

62. Voetsch, A.C., Gilder, T.J.V., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C., and Tauxe R.V., 2004, FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal Salmonella Infections in the United States

63. Yu, K., Hu, S., Huang, J., & Mei, L. H. (2011). A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase. Enzyme and Microbial Technology, 49(3), 272-276.

64. Wilson, W. J., & Blair, E. M. M. V. (1926). A combination of bismuth and sodium sulphite affording an enrichment and selective medium for the typhoidparatyphoid groups of bacteria. The Journal of Pathology and Bacteriology, 29(3), 310-311.

65. WHO., 2002; 2010, ***Salmonella***[Online], Available:http://www.who.int/topics/salmonella/en/ [2010, September 16].

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

1.1 Khueankhancharoen, J, Saranak, J and Thipayarat, A., 2017, "Optimization of Amino Acid Decarboxylation and Sugar Fermentation to Enhance Hydrogen Sulfide Production for Rapid Screening of *Salmonella* during Selective Enrichment", Proceeding of the 13rd The Asian Congress on Biotechnology 2017 (ACB2017) Bioinnovation and Bioeconomy", July 23 – 27, 2017, Khon Kaen, Thailand.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป

ชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของซัลโมเนลลา มีการนำผลงานไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจเดี่ยวกับอุตสาหกรรมโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์จากไก่ เพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ไก่และตรวจสอบความสะอาดของวัสดุ อุปกรณ์เครื่องจักร ด้วยการ swab testing เป็นการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดี เพื่อเป็นแนวทางเลือกใหม่ของการวิเคราะห์ของโรงงาน ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โรงงานสามารถที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมาก ทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องน่าเชื่อถือ อีกทั้งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยเมื่อเทียบกับวิธีการในปัจจุบันที่โรงงานใช้อยู่ ส่งผลให้สามารถส่งสินค้าได้ทันกับความต้องการของลูกค้า ช่วยลดค่าใช้จ่ายของสินค้าคงคลัง

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัย สามารถเป็นแนวทางต่อยอดการพัฒนาชุดตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคชนิดอื่นที่ช่วยลดดุลการค้าจากการนำเข้าชุดทดสอบที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ เป็นการส่งเสริมศักยภาพความสามารถนักวิทยาศาสตร์ไทย