

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 Mini-VIDAS (Biomerieux)
- 1.2 เครื่องตีปั่นผสมอาหาร (AES Laboratoire รุ่น MIX 1)
- 1.3 เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (Hermle รุ่น Z 233 MK)
- 1.4 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Memmert)
- 1.5 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Clayson รุ่น IM 1000)
- 1.6 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น CFC FREE)
- 1.7 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส (Gallenkamp)
- 1.8 ตู้อบลมร้อน (Memmert)
- 1.9 ตู้แช่แข็ง (Super Clean รุ่น 150 VC)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (ภาคผนวก ก)

- 2.1 Baird Parker Agar
- 2.2 Plate Count Agar
- 2.3 Trypticase Soy Agar
- 2.4 Trypticase Soy Broth
- 2.5 Butterfield's Phosphate Buffer
- 2.6 0.02 M Phosphate Saline Buffer
- 2.7 Human Plasma
- 2.8 ชุดย้อมแกรม

3. อุปกรณ์

- 3.1 Staphylococcal Enterotoxin-Reversed Passive Latex Agglutination (SET- RPLA) (Oxoid)
- 3.2 VIDAS Staph Enterotoxin II (Biomerieux)
- 3.3 96 Well Microtitre Plate
- 3.4 ชุดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API Staph (Biomerieux)

วิธีทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 ซื้อมตัวอย่างเนื้อปูต้มสุกส่วนหัวจากร้านจำหน่ายปลีก ซึ่งบรรจุในถุงพลาสติก และแช่เย็นในน้ำแข็ง (ภาคผนวก ข) จากตลาดหนองมน ตลาดอ่างศิลา ตลาดชลบุรี และตลาดศรีราชา ตัวอย่างละจำนวน 200 กรัม รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง

1.2 บรรจุเนื้อปูในถุงพลาสติกใหม่ เก็บเนื้อปูในกล่องบรรจุน้ำแข็งขณะขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: วิเคราะห์เนื้อปูที่เก็บในกล่องบรรจุน้ำแข็งภายใน 60 นาที หลังนำมาถึงห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมตัวอย่าง (Andrew & Hammack, 1998)

2.1 ซึงตัวอย่างปูต้มสุก ตัวอย่างละ 25 กรัม เติม Butterfield's Phosphate Buffer ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นเป็นเวลา 60 วินาที

2.2 ได้ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ 10^{-1}

3. การนับจำนวนแบคทีเรียทั่วไป (Maturin & Peeler, 1998)

3.1 เจือจางตัวอย่างจากข้อ 2.2.2 ใน Butterfield's Phosphate Buffer จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

3.2 ถ่ายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร Plate Count Agar จำนวนสองจาน จานละ 0.5 มิลลิลิตร

3.3 เคลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมร่อนผิวหน้าอาหารแห้ง

3.4 บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

3.5 เลือกนับจานที่มี 25-250 โคโลนี

3.6 คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ ดังนี้

$$N = EC / [(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times d$$

เมื่อ N = จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรหรือกรัมตัวอย่าง

EC = ผลรวมของทุกโคโลนีทุกจานอาหาร

n_1 = จำนวนจานอาหารของค่าการเจือจางแรกที่นับได้

n_2 = จำนวนจานอาหารของค่าการเจือจางที่สองที่นับได้

d = ส่วนกลับของการเจือจางที่ต่ำสุดที่นับได้

4. นับจำนวน *S. aureus* (Bennett & Lancette, 1998)

4.1 เจือจางตัวอย่างจากข้อ 2.2 ใน 0.02 M Phosphate-Saline Buffer ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

4.2 ถ่ายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร Baird-Parker Agar จำนวนสามจาน (ปริมาตรจานละ 0.4 0.3 และ 0.3 มิลลิลิตร)

4.3 เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวน้ำอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมร่อนผิวน้ำอาหารแห้ง

4.4 บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

4.5 เลือกโคโลนีที่สงสัยจากระดับความเจือจางที่มี 20-200 โคโลนี จานละ 2 โคโลนี ทดสอบโคเอกกูเลส (ภาคผนวก ก) และเก็บไว้บนอาหาร Trypticase Soy Agar

4.6 จำแนกยืนยันด้วยชุดทดสอบ API (ภาคผนวก ก)

4.7 คำนวณจำนวน *S. aureus* ดังนี้

$$N = \text{จำนวน โคโลนีทั้งหมดจากสามจาน} \times \text{ส่วนกลับของความเจือจาง}$$

5. ทดสอบการผลิตและแยกชนิดเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 ทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดัดแปลงจาก Soriano et al., 2002; Meyrand et al., 1998)

5.1.1 เพาะ *S. aureus* ที่เก็บไว้แต่ละโคโลนี (จำนวน 6 โคโลนีต่อตัวอย่าง) ลงในอาหาร Trypticase Soy Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวมาปรับ pH เป็น 7.5-8.0

5.1.4 ถ่ายส่วนของเหลวลงในสตริปของ SET2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

5.1.5 นำสตริปใส่ในเครื่อง Mini VIDAS ในช่องใส่สตริปและสเปอร์ในช่องใส่สเปอร์ เปิดคำสั่งให้เครื่องทำงาน (ภาคผนวก ก)

5.1.6 บันทึกผล *S. aureus* ที่สามารถผลิตเอนเทอโรทอกซินได้

5.2 จำแนกชนิดของเอนเทอโรทอกซิน ด้วย SET-RPLA (ดัดแปลงจาก Soriano, 2002)

5.2.1 นำเชื้อที่ให้ผลเป็นบวกในข้อ 5.1.8 มาเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสมาใช้ในการทดสอบ ดังนี้

5.2.2.1 เติม Diluent 25 ไมโครลิตรลงใน Microtitre Plate 40 หลุม
(8 หลุม x 5 แถว) ดังภาพที่ 7

5.2.2.2 เติมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของแต่ละแถว จากนั้น
เจือจางเป็นสองเท่าในหลุมถัดมาจนถึงหลุมที่เจ็ด

5.2.2.3 เติม Antibody ต่อ SE ชนิดต่าง ๆ ลงในหลุมของ Microtitre Plate

แถว	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								

ภาพที่ 7 Microtitre Plate ที่มีตัวอย่างและ Antibody ดังนี้

- A. เติม Antibody A ลงในหลุมที่ 1-7 ของแถวที่ 1
- B. เติม Antibody B ลงในหลุมที่ 1-7 ของแถวที่ 2
- C. เติม Antibody C ลงในหลุมที่ 1-7 ของแถวที่ 3
- D. เติม Antibody D ลงในหลุมที่ 1-7 ของแถวที่ 4
- E. เติม Latex Control ลงในหลุมที่ 1-7 ของแถวที่ 5

5.2.2.4 บ่มจานที่อุณหภูมิห้องในกล่องที่ชื้น สังเกตการตกตะกอน และบันทึก
ชนิดของเอนเทอโรทอกซิน

6. ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ
S. aureus

6.1 การเตรียมหัวเชื้อ (ดัดแปลงจาก Vora, Senecal, & Schaffner, 2003)

6.1.1 เลี้ยง *S. aureus* ผลิตเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิดที่แยกได้ใน Trypticase

Soy Broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.1.2 ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กมีฝาปิดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.1.3 ทิ้งส่วนของเหลว ดังเซลล์ที่ได้ด้วย Butterfield's Phosphate Buffer นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์

6.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ปรับค่าให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

6.2 การเตรียมตัวอย่างและการใส่เชื้อเริ่มต้น

6.2.1 แบ่งตัวอย่างใส่ถุงทนร้อน ถุงละ 25 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.2.2 แบ่งตัวอย่างสำหรับ 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

6.2.2.1 ชุดการทดลองที่ 1 ถ่ายเชื้อจากข้อ 6.1.4 ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กระจายเชื้อให้ทั่วตัวอย่างโดยการบดด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยมได้ความเข้มข้นเซลล์ เริ่มต้นเป็น 10^3 เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง จำนวน 3 ถุง

6.2.2.2 ชุดการทดลองที่ 2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 6.1.4 ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กระจายเชื้อให้ทั่วตัวอย่างโดยการบดด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^5 เซลล์ต่อกรัมตัวอย่าง จำนวน 3 ถุง

6.2.3 นำตัวอย่างแต่ละชุดเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 7, 30 และ 40 องศาเซลเซียส

6.2.4 เก็บตัวอย่างที่ทุกอุณหภูมิไปนับจำนวนเชื้อที่ชั่วโมงเริ่มต้น (0 ชั่วโมง)

บนจานอาหาร Trypticase Soy Agar

6.2.5 เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 7, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มานับจำนวนเชื้อทุก 12, 6 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเกลี่ยเชื้อบนจานอาหาร Trypticase Soy Agar (ภาคผนวก ค) นำค่าที่ได้คำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดและ ระยะแล็ก (Lag Time) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Microfit Ver 1.0 (Wilson, 2007)

6.2.6 เก็บตัวอย่างที่ทุกอุณหภูมิมาตรวจวัดการผลิตเอนเทอโรทอกซินโดยวิธี SET-RPLA ดังนี้

6.2.6.1 แบ่งตัวอย่าง 10 กรัม เติมน้ำละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.2.6.2 ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กมีฝาปิดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6.2.6.3 เป็นการตรวจวัดเอนเทอเพอติคตามข้อ 5.2.2.1 ถึงข้อ 5.2.2.3

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

7.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

7.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS Ver 11.5 วิเคราะห์แบบ LSD