บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1.วิธีดำเนินการวิจัย

3.1.1 ค้นคว้าหาข้อมูล วางแผนการทำงาน

3.1.2 ทำเรื่องขออนุญาตใช้ห้องปฏิบัติการในการศึกษา

-ขออนุญาตทำการศึกษาเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ดิบที่นำมาส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ต.นาบัว อเมือง จ. สุรินทร์ โดยนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ จำแนกเชื้อและทดสอบการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ

3.2 สถานที่ทำการศึกษา

- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์ (ศวพ.สุรินทร์) เป็นหน่วยงานที่ทำการตรวจวินิจฉัย วิเคราะห์ ทดสอบ ชันสูตรโรคสัตว์และตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ในพื้นที่ 8 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา ชัยภูมิ บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี อำนาจเจริญและยโสธร

รูปที่ 3.1 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตตอนล่าง จังหวัดสุรินทร์ (ศวพ.สุรินทร์)

3.3 ประชากร

เนื้อสัตว์ดิบที่นำมาส่งตรวจที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างจังหวัดสุรินทร์ ต.นาบัว อ.เมือง จ.สุรินทร์ และตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างจังหวัดสุรินทร์ ในช่วงมกราคม 2564 ถึงมีนาคม 2564

รูปที่ 3.2 ประชากรเนื้อสัตว์

3.4 การเก็บตัวอย่าง

เก็บเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เพาะแยกได้จากเนื้อสัตว์ดิบในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ระหว่างเดือน มกราคม 2564 -มีนาคม 2564 จำนวนเนื้อสัตว์ดิบทั้งหมด 181 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเนื้อสุกรดิบ 111 ตัวอย่างและเนื้อไก่ดิบ 70 ตัวอย่าง

รูปที่ 3.3 ตัดชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp.

3.5 การทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

3.5.1 เก็บตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เพาะแยกได้จากเนื้อสัตว์ดิบในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MULLER-KAUFFMANN Tetrathionate Novobiocin broth (MKTTn) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง และ Rappaport Vassiliadis soya peptone broth (RVS) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41.5±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา Streak ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA และ XLD บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง เลือกโคโลนีจากแต่ละ Plate มาทำ Subculture ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง เพื่อเก็บเชื้อ

รูป 3.4 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.2 การเก็บเชื้อกลุ่ม *Salmonella spp.* นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ไปเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vassiliadis soya peptone broth (RVS) 0.1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 41.5±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมงและ Streak ลง อาหารเลี้ยงเชื้อ BGA และ XLD และ MULLER-KAUFFMANN Tetrathionate Novobiocin broth (MKTTn) 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง Streak ลง plate BGA และ plate XLD บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง เลือกโคโลนีจากแต่ละ Plate Subculture ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส 24±3 ชั่วโมง

3.5.3 การบ่งชี้ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย โดยจะทำการเตรียมเชื้อเพื่อทำการทดสอบโดยแยกเชื้อจากเนื้อสัตว์ดิบที่ส่งตรวจ พิสูจน์เชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Biochemical test

1. การทดสอบ TSI test เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการ ferment น้ำตาล glucose, lactose และ sucrose

2. การทดสอบ LIM test

2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Lysine

- Lysine decarboxylase test (LDC)

Positive = ไม่เปลี่ยนแปลงของสีอาหาร (salmonella)

Negative = อาหารเปลี่ยนสี โดยเกิดชั้นบนผิวอาหารเป็นสีเหลือง และชั้นล่างเป็นสีม่วง

- Lysine deaminase test (LDA)

Positive = อาหารเปลี่ยนสี โดยชั้นบนเชื้อ salmonella ไม่สร้างเอนไซม์ อาหารเป็นสีเหลืองและชั้นล่างเป็นสีม่วง

Negative = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร (salmonella)

2.2 การทดสอบการสร้าง lndole โดยหยดน้ำยา Kovac’s reagent 5 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ salmonella จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

Positive = เกิดสีแดงเข้มบนผิวอาหาร

Negative = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (salmonella)

2.3 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) เชื้อ salmonella ไม่สร้าง Indole

Positive = เกิดการเคลื่อนที่ของเชื้อตามรอย Stap และบนผิวอาหาร (salmonella)

Negative = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

3. การทดสอบ Urease test เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ Urease ทำให้ยูเรียแตกตัวเป็นแอมโมเนีย

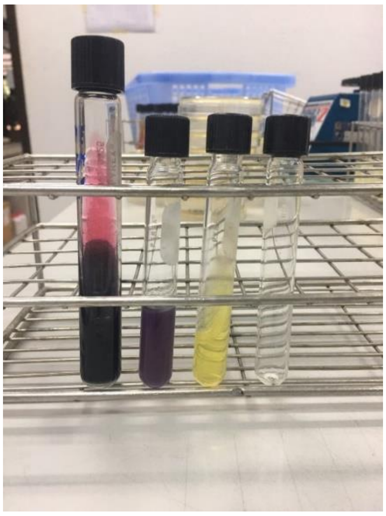
Positive = เปลี่ยนเป็นสีชมพู, บานเย็น

Negative = ไม่เกิดการ เปลี่ยนแปลง (salmonella)

4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ B-galactosidase โดยอาหารที่ทดสอบมีส่วนประกอบของน้ำเกลือ 0.85% และ ONPG disc

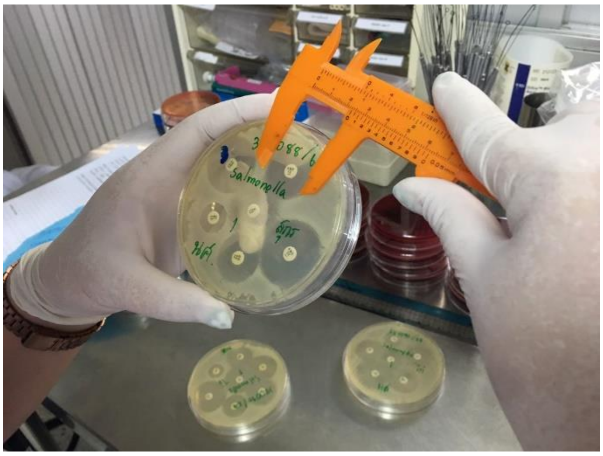
Positive = อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Negative = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอาหารที่ทดสอบ (salmonella)



รูปที่ 3.3 การทดสอบ Biochemical test

3.5.4 วิธีการทำการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียโดยวิธี Agar disc diffusion การทดสอบความไวต่อยา (Drug sensitivity test) ทำโดยการนำเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบนอาหาร Plate count agar (PCA) ทำการแยกเชื้อ โดยเทคนิค Plate Subculture บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ ใช้ cotton swab จุ่มเชื้อข้างต้นเขี่ยส่วนบนของโคโลนีเดี่ยว ที่มีลักษณะเหมือนกัน 3-5 โคโลนี ปรับความขุ่นด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland วัดความขุ่นด้วยตา ในที่ที่มีแสงสว่างเพียงพอ เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) วางแผ่นยาปฏิชีวนะ13 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส โดยใช้ vernier caliper สำหรับการทดสอบกับแผ่นยามาตรฐาน นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)



รูปที่ 3.4 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone

3.6การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และปัจจัยข้อมูลพื้นฐานบรรยายข้อมูลการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ศึกษาในงานวิจัยเชิงปริมาณ ประกอบด้วยการแจกแจงความถี่เป็นจำนวน ร้อยละ โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนาเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐาน

3.7 ระยะเวลาในการวิจัย (Research Plan)

	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม
1.สืบค้นเอกสารที่เกี่ยวข้อง	←	→			
2.เก็บตัวอย่าง		←	—	→	
3.ตรวจวิเคราะห์ผล			←	—	→
4.เขียนรายงาน				←	→