บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (Cross sectional descriptive study)

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย คือ อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะ จากสถานสงเคราะห์เด็กในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

ประชากรศึกษา คือ อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะ จากสถานสงเคราะห์เด็ก ในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล สังกัดกรมพัฒนาสังคมและสวัสดิการ กระทรวงการพัฒนาสังคมและความมั่นคงของมนุษย์ จำนวน 7 แห่ง ประกอบด้วยอาหารปรุงสำเร็จ รวม 60 ตัวอย่าง น้ำดื่ม รวม 30 ตัวอย่าง และภาชนะ รวม 132 ตัวอย่าง ดังนั้นจำนวนตัวอย่างรวมทั้งหมด 222 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง คือ อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะ ในสถานสงเคราะห์เด็กทั้ง 7 แห่ง โดยไม่มีการสุ่มตัวอย่าง จำนวน 222 ตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่าง *(30)*

$$n = \frac{Z^2pq}{d^2}$$

เมื่อ n = ขนาดของตัวอย่าง

Z = 1.96 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

p = ความชุกของการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ในอาหารพร้อมบริโภคและอุปกรณ์ประกอบอาหาร ร้อยละ 11 = 0.11 *(24)*

q = 1 - p = 0.89

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ = 0.05

เมื่อแทนค่าในสูตร จะได้จำนวนกลุ่มตัวอย่าง 150 ตัวอย่าง

เพราะฉะนั้นขนาดตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ = 150 ตัวอย่าง

แต่ผู้วิจัยต้องการจะเก็บตัวอย่างทั้ง 3 เวลา คือ เวลาอาหารเช้า อาหารกลางวัน และอาหารเย็น ดังนั้นจึงต้องเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ในสถานสงเคราะห์เด็กแต่ละแห่ง และในการเก็บตัวอย่าง 1 ครั้ง ในสถานสงเคราะห์เด็กทั้ง 7 แห่ง จะได้ตัวอย่างรวมทั้งหมด 74 ตัวอย่าง เพราะฉะนั้นเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ในสถานสงเคราะห์เด็กทั้ง 7 แห่ง จะได้ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 222 ตัวอย่าง

ขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เตรียมเครื่องมือในการวิจัย ได้แก่ แบบสังเกตสภาวะสุขาภิบาลอาหาร และการตรวจวิเคราะห์อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะทางห้องปฏิบัติการ
2. ทำหนังสือขอความร่วมมือ จากภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม ไปถึงผู้ปกครองสถานสงเคราะห์ เพื่อขออนุญาตทำการศึกษาและเก็บข้อมูล
3. ดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูล โดยใช้เวลาในการเก็บรวบรวมข้อมูลภายในระยะเวลา 5 เดือน
4. บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์ และแปลผล

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย แบบสังเกตสภาวะสุขาภิบาลอาหาร และการตรวจวิเคราะห์อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

<u>ส่วนที่ 1</u> แบบสังเกตสุขาภิบาลอาหาร ซึ่งประยุกต์มาจากแบบสำรวจโรงอาหารตามมาตรฐานการสุขาภิบาล กองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข *(31)* แบ่งเป็น 7 ด้าน ได้แก่

1. สถานที่รับประทานอาหาร และบริเวณทั่วไป
2. สถานที่เตรียม-ปรุงอาหาร
3. อาหาร
4. ภาชนะ อุปกรณ์
5. การรวบรวมขยะและน้ำโสโครก
6. ห้องน้ำ ห้องส้วม
7. ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ

<u>ส่วนที่ 2</u> การตรวจวิเคราะห์อาหารปรุงสำเร็จ น้ำดื่ม และภาชนะทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่

1. วัสดุอุปกรณ์ ประกอบด้วย เครื่องชั่งสาร, ช้อนตักสาร, เครื่องผสมสาร (Vortex mixer), เครื่องตบอาหาร (Stomacher), หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (Autoclave), ตู้อบไอร้อน (Hot air oven), เตาอบไมโครเวฟ (Microwave), ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), ถุงสำหรับตบอาหารปราศจากเชื้อ, ขวดปราศจากเชื้อ, เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (Needle), เข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วง (Loop), ไม้พันสำลี (Cotton swab), แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader), ปิเปตต์ (Pipette), ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask), บีกเกอร์ (Beaker), กระบอกตวง (Cylinder), หลอดทดลองและฝาหลอด (Test tube and Cap), หลอดดักก๊าซ (Durham tube), ช้อนตักตัวอย่างอาหารปราศจากเชื้อ, กรรไกรปราศจากเชื้อ และจานเพาะเชื้อ (Petridishes)

2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Media) ประกอบด้วย

- Plate count agar (PCA; MERCK, Germany) สำหรับการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count)

- Lactose broth (LB; MERCK, Germany), Brilliant green lactose bile broth (BGLB; MERCK, Germany), EC broth และ MacConkey agar (MC; DIFCO, France) สำหรับการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli*

- Mannitol egg yolk kanamycin (MYK; MERCK, Germany) และ Blood agar (BA; MERCK, Germany) สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

- Mannitol salt egg yolk agar (MSEY; MERCK, Germany) และ Trypticase soy broth (TSB; MERCK, Germany) + 10% NaCl สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. aureus*

- Salmonella–Shigella agar (SS; MERCK, Germany), Buffer peptone water (BPW; MERCK, Germany) และ Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV; MERCK, Germany) สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

- Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS; MERCK, Germany) และ Alkaline peptone water (APW; MERCK, Germany) สำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus*

3. อาหารสำหรับทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) เป็นขั้นตอนการวินิจฉัยเชื้อ หลังจากแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกโคโลนีที่แยกได้ไปทดสอบ นำผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปเทียบกับตารางมาตรฐาน เพื่อวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรีย อาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่

Triple sucrose iron agar (TSI; MERCK, Germany), Lysine indole motility medium (LIM; DIFCO, France), Methyl red broth (MR; MERCK, Germany), Voges-Proskauer (VP,semisolid; MERCK, Germany), Simmon's citrate agar (SC; DIFCO, France), Urea agar (MERCK, Germany), Salt tolerance test : APW + 0% NaCl, APW + 3% NaCl, APW + 6% NaCl, APW + 8% NaCl และ APW + 10% NaCl

4. น้ำยาและสารเคมี ประกอบด้วย Kovac's reagent, MR reagent, VP reagent, Oxidase test reagent, Gram stain reagent, Immersion oil, 95% alcohol, 0.85% sodium chloride หรือ Sterile normal saline solution (NSS) และ Phosphate Buffer Solution (PBS) pH 7.2

สถานที่ทำการตรวจวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การเก็บตัวอย่าง *(32)*

1. อาหารปรุงสำเร็จ

1.1 ใช้ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อตามกรรมวิธีที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ สำหรับใช้เก็บตัวอย่างอาหาร

1.2 ใช้ที่ตักอาหารสุ่มตัวอย่างหลายๆจุด แล้วบรรจุในถุงพลาสติก ประมาณ 200 กรัม ระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนจากภายนอกได้

1.3 ปิดปากถุงให้สนิท รีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

2. น้ำดื่ม

2.1 ทำความสะอาดหัวก๊อกน้ำ

2.2 เปิดน้ำที่ค้างอยู่ในท่อทิ้งไปก่อน โดยเปิดก๊อกให้น้ำไหลเต็มที่เป็นเวลา 1-2 นาที

2.3 ใช้ไฟลนปากก๊อกน้ำเพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 1 นาที

2.4 เปิดก๊อกน้ำ เพื่อเก็บตัวอย่าง โดยเปิดให้น้ำไหลปานกลางประมาณ 1-2 นาที เก็บประมาณ 2/3 ของขวด ก่อนปิดขวดลนไฟรอบปากขวด ปิดขวดให้แน่น

2.5 ปิดฉลากให้เรียบร้อย

2.6 นำขวดตัวอย่างน้ำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ระหว่างการขนส่งเพื่อส่งตรวจ

2.7 นำส่งห้องปฏิบัติการทันที เพื่อทำการวิเคราะห์เชื้อ

3. ภาชนะ

3.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ 1 อัน จุ่มลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS pH 7.2) ในหลอดที่เตรียมไว้ ยกขึ้นมาเหนือบัฟเฟอร์แล้วกดสำลีที่ข้างหลอดด้านใน พร้อมกับหมุน 2-3 รอบ เพื่อให้สำลีแห้งพอหมาดๆ

3.2 นำไม้พันสำลีที่ชุ่มบัฟเฟอร์หมาดๆ ไปป้ายหรือเช็ดภาชนะที่ต้องการตรวจ จำนวน 5 ชิ้น เหมือนๆกัน เช่น จาน หรือช้อน เป็นต้น โดยป้ายบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร ป้ายซ้ำๆกันในเนื้อที่เดิม 2-3 ครั้ง

3.3 นำไม้พันสำลี จุ่มและแกว่งในหลอดบัฟเฟอร์หลอดเดิม แล้วบิดให้แห้งพอหมาดๆ ไปป้ายภาชนะชิ้นที่สองต่อไป แล้วทำเช่นเดียวกันนี้จนครบ 5 ชิ้น ครั้งสุดท้ายให้เก็บไม้พันสำลีไว้ในหลอดบัฟเฟอร์ โดยหักก้านออกพอให้ปิดฝาหลอดได้ แล้วแช่ในกล่องน้ำแข็ง นำส่งห้องปฏิบัติการทันที

วิธีตรวจวิเคราะห์ *(33,34)*

1. **ตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด** (Total bacterial count) **โดยวิธี** Standard Plate Count

1.1 วิธีวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร

1.1.1 ชั่งอาหารตัวอย่าง 25 กรัม ในถุงสำหรับตบอาหาร เติม NSS 225 มิลลิลิตร

1.1.2 ทำการเจือจางด้วย NSS ความเจือจางตามต้องการ (10^{-1},10^{-2},10^{-3}...)

1.1.3 นำอาหารที่มีความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-4} มา spread บน PCA

1.1.4 บ่มไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

1.1.5 นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

1.1.6 คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่ออาหาร 1 กรัม

1.2 วิธีวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำดื่ม

1.2.1 เขย่าตัวอย่างน้ำหรือเครื่องดื่มให้เข้ากันดี

1.2.2 ทำการเจือจางด้วย NSS ความเจือจางตามต้องการ (10^{-1},10^{-2},10^{-3}...)

1.2.3 นำน้ำที่มีความเจือจาง undilute ถึง 10^{-3} มา spread บน PCA

1.2.4 บ่มไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

1.2.5 นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

1.2.6 คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร

1.3 วิธีวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดของภาชนะ

1.3.1 นำ PBS ที่เก็บตัวอย่างภาชนะมาเขย่า โดยใช้ vortex mixer แล้วเจือจางด้วย NSS ให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 1 ต่อ 10 ถึง 1 ต่อ 1,000 (10^{-1} ถึง 10^{-3})

1.3.2 นำตัวอย่างทั้งที่ไม่เจือจาง และที่เจือจางแล้ว (ความเจือจาง undilute ถึง 10^{-3}) ปริมาตร 0.1 มลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ทำสองเพลทคู่กัน ด้วยวิธี spread plate

1.3.3 นำ PCA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.3.4 นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในจานอาหารที่มีเชื้อขึ้นจำนวนระหว่าง 25-250 โคโลนี แล้วคำนวนหาจำนวนแบคทีเรียต่อภาชนะ 1 ชิ้น

2. ตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อโคลิฟอร์ม ฟีคัลโคลิฟอร์ม และ *E. coli* โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

2.1 การหาค่า MPN coliforms, Fecal coliforms และ *E. coli* ในอาหาร

2.1.1 ดูดอาหาร ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-3} ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงใน single lactose broth ความเจือจางละ 3 หลอด (3x3)

2.1.2 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

2.1.3 บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ก๊าซ และถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ก๊าซลงใน BGLB และ EC broth

2.1.4 บ่มหลอด BGLB ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

2.1.5 อ่านผลหลอด BGLB ที่ให้ก๊าซ และเทียบกับตาราง MPN ระบบ 3x3 ได้เป็นค่า MPN coliforms

2.1.6 บ่มหลอด EC broth ไว้ที่ 44.5 องศาเซลเซียส ใน waterbath 48 ชั่วโมง

2.1.7 อ่านผลจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ก๊าซ และเทียบกับตาราง MPN ระบบ 3x3 ได้เป็นค่า MPN Fecal coliforms

2.1.8 บันทึกหลอด EC broth ที่ให้ก๊าซ และนำไปตรวจสอบยืนยัน *E. coli*

2.1.9 อ่านผลจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลยืนยันเป็น *E. coli* เทียบกับตาราง MPN ระบบ 3x3 ได้เป็นค่า MPN *E. coli*

2.2 การหาค่า MPN coliforms, Fecal coliforms **และ** *E. coli* **ในน้ำดื่ม**

2.2.1 ดูดตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจใส่ลงใน double strength lactose broth 5 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร และดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน single lactose broth ปริมาตรละ 1 หลอด (ระบบ 5 1 1)

2.2.2 นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2.2.3 อ่านผลและบันทึกจำนวนหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นใน Durham tube และถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีก๊าซลงใน Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) และ EC broth

2.2.4 นำ BGLB เข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ส่วน EC broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2.2.5 อ่านผลหลอด BGLB ที่ให้ก๊าซ และนำผลไปเทียบตาราง MPN ระบบ 5 1 1 จะได้เป็นค่า MPN coliforms ส่วนหลอด EC broth ที่ให้ก๊าซ นำผลไปเทียบกับตาราง MPN ระบบ 5 1 1 เช่นกัน จะ ได้เป็นค่า MPN Fecal coliforms

2.2.6 บันทึกหลอด EC broth ที่ให้ก๊าซ และนำไปตรวจสอบยืนยัน *E. coli*

2.2.7 อ่านผลจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลการยืนยันเป็น *E. coli* นำไปเทียบกับตาราง MPN ระบบ 5 1 1 จะได้เป็นค่า MPN *E. coli*

การตรวจสอบยืนยัน *E. coli*

ถ้าต้องการตรวจยืนยัน *E. coli* ให้ถ่ายเชื้อจากหลอด EC broth ที่ให้ก๊าซ โดยการ streak ลงบน MacConkey agar บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือก pick up โคโลนีที่มีขนาดประมาณ 2-4 มิลลิเมตร สีชมพู กลม แบน ผิวหน้าค่อนข้างแห้ง อาจมีโซนขุ่นรอบๆโคโลนี นำไปทดสอบ biochemical test ได้แก่ IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskaure, Simmon's Citrate) ถ้าเป็น *E. coli* จะให้ผล IMViC เป็น + + - -

3. ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *S. aureus, B. cereus, Salmonella* spp. และ *V. parahaemolyticus*

3.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. aureus* **โดยวิธี** Direct Count

3.1.1 spread บน MSEY อาหารความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-4}

3.1.2 บ่มไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

3.1.3 เลือกนับจำนวนโคโลนีของ *S. aureus* (สีเหลืองมีโซนขุ่นรอบโคโลนี)

3.1.4 pick โคโลนีที่เลือกนับ 1-2 โคโลนี ไปทดสอบ coagulase test เพื่อยืนยันว่าเป็น *S. aureus*

3.1.5 คำนวณหาจำนวน *S. aureus* ต่ออาหาร 1 กรัม

3.2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* โดยวิธี Direct Count

3.2.1 spread บน MYK อาหารความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-4}

3.2.2 บ่มไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

3.2.3 เลือกนับจำนวนโคโลนีของ *B. cereus* (สีขาว ขอบไม่เรียบ มีโซนขุ่นรอบโคโลนี)

3.2.4 pick โคโลนีที่เลือกนับ 1-2 โคโลนี ไปทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงแกะเพื่อยืนยันว่าเป็น *B. cereus*

3.2.5 คำนวณหาจำนวน *B. cereus* ต่ออาหาร 1 กรัม

3.3 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธี Enrichment

3.3.1 ชั่งอาหาร 25 กรัม ใส่ลงใน Buffer peptone water (BPW) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3.3.2 นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.3.3 ใช้ pasteur pipette ดูดเชื้อจาก BPW นำมาหยดบน Modified Semisolid Rapaport Valasilidis (MSRV) จำนวน 4 หยด (หยดใกล้ขอบเพลท ให้แต่ละจุดห่างกันพอสมควร)

3.3.4 บ่มเชื้อที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.3.5 ตรวจดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ โดยที่เชื้อจะเจริญขึ้น และ spread ออกจากจุดที่หยดเชื้อไว้บน MSRV ใช้ needle แตะเชื้อที่มีลักษณะการเคลื่อนที่ บริเวณด้านนอกให้ห่างจากจุดที่หยดเชื้อ โดยจากจุดที่หยดเชื้อ 1 หยดนั้น ให้แตะเชื้อมา 4 บริเวณ จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ได้แก่ TSI, MIL และ Urease test

3.3.6 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.3.7 อ่านผลโดยที่เชื้อ *Salmonella* spp. จะให้ผลปฏิกริยาชีวเคมีดังนี้

- TSI ให้ผล : acid butt / alkaline slant, gas production + / (-), H_2S production +/ (-)

I22020883

- MIL ให้ผล : motility +, Indole -, lysine + / (-)

- Urease test +

3.3.8 เชื้อที่ให้ผลปฏิกิริยาชีวเคมีเป็น *Salmonella* spp. ให้นำมาทดสอบต่อ เพื่อยืนยันผล ด้วยการนำเชื้อมาทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับ antiserum ที่จำเพาะต่อ *Salmonella* spp. ด้วยวิธี slide agglutination

3.3.9 รายงานผลการตรวจ พบหรือไม่พบ *Salmonella* spp. ต่ออาหาร 25 กรัม

3.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahemolyticus*

3.4.1 ชั่งอาหาร 25 กรัม ใส่ลงใน APW+2% NaCl 150 มิลลิลิตร

3.4.2 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4.3 ถ่ายเชื้อจาก APW+2% NaCl โดย streak ลงบน TCBS agar

3.4.4 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4.5 เลือกดูโคโลนีสีเขียว ตรงกลางเข้ม ขนาด 2-3 มิลลิเมตร

3.4.6 ทดสอบ oxidase test และเลือกดูเฉพาะที่ให้ผล oxidase +

3.4.7 ทดสอบ biochemical test โดย pick โคโลนีที่สงสัยลงใน TSI, LIM และ NA slant ซึ่ง *V. parahemolyticus* ให้ผลดังนี้ TSI เป็น K/A, gas-, H_2S- และ LIM เป็น +, +, +

3.4.8 รายงานผล พบหรือไม่พบ ในอาหาร 25 กรัม

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) ในตัวแปรต่างๆ ที่ศึกษา นำเสนอในรูปตาราง แผนภูมิ หรือกราฟ ตามความเหมาะสม