abst

ข้อมูลข่าวสาร วศ.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ
กช
อว 3

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาวิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบด

นายเกรียงไกร นาคะเกศ
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

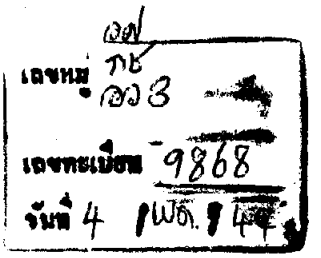
กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

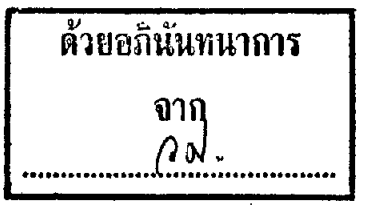
เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาวิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบด



นายเกรียงไกร นาคะเกศ
ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5



กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ อี.โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบดจำนวน 20 ตัวอย่างจากตลาดต่างๆในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 3 วิธี วิธีที่ 1 ใช้ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเชื้อที่สงสัยไปทดสอบด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์ เชื้อที่ตกตะกอนคือ อี.โคไล โอ157 วิธีที่ 2 ใช้ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอี.โคไล โอ157 จะสร้างโคโลนีสีเขียวและไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต วิธีที่ 3 ใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra ประเทศออสเตรเลีย เชื้อที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาในชุดทดสอบแล้วให้สีเขียว โดยเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสี แสดงว่าเป็น อี.โคไล โอ157

จากการศึกษาพบว่าวิธีที่ 1 พบอี.โคไล โอ157 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 15 ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด วิธีที่ 2 ผลปรากฏว่า ไม่พบอี.โคไล โอ157ในทุกตัวอย่าง วิธีที่ 3 พบอี.โคไล โอ157 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 65 ของตัวอย่างทั้งหมด

วิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 โดยใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra เป็นวิธีที่ให้ผลชัดเจนกว่า ทำได้รวดเร็ว แต่ราคาแพงกว่าอีกสองวิธี

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ อี.โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบดจำนวน 20 ตัวอย่างจากตลาดต่างๆในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 3 วิธี วิธีที่ 1 ใช้ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำเชื้อที่สงสัยไปทดสอบด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์ เชื้อที่ตกตะกอนคือ อี.โคไล โอ157 วิธีที่ 2 ใช้ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอี.โคไล โอ157 จะสร้างโคโลนีสีเขียวและไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต วิธีที่ 3 ใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra ประเทศออสเตรเลีย เชื้อที่ทำปฏิกิริยากับน้ำยาในชุดทดสอบแล้วให้สีเขียว โดยเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสี แสดงว่าเป็น อี.โคไล โอ157

จากการศึกษาพบว่าวิธีที่ 1 พบอี.โคไล โอ157 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 15 ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด วิธีที่ 2 ผลปรากฏว่า ไม่พบอี.โคไล โอ157ในทุกตัวอย่าง วิธีที่ 3 พบอี.โคไล โอ157 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 65 ของตัวอย่างทั้งหมด

วิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 โดยใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra เป็นวิธีที่ให้ผลชัดเจนกว่า ทำได้รวดเร็ว แต่ราคาแพงกว่าอีกสองวิธี

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	i
สารบาญตาราง	ii
สารบาญรูปภาพ	iii
1. คำนำ	1
วัตถุประสงค์	6
ระยะเวลาการดำเนินงาน	6
ประโยชน์ที่ได้รับ	7
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
3. ผลการทดลอง	16
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	24
5. สรุปผลการทดลอง	26
กิตติกรรมประกาศ	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวกอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	32

สารบาญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบด	9
ตารางที่ 2	จำนวนบักเตรีในเนื้อวัวสดบดที่เจริญบนซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์	19
ตารางที่ 3	ผลการทดสอบยืนยันอี.โคไล โอ157โดยใช้ชุดทดสอบลาเท็กซ์ สำหรับ อี.โคไล โอ157	20
ตารางที่ 4	ผลการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบดโดยใช้ฟลูออโรคัลท์อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์	21
ตารางที่ 5	ผลการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบดโดยใช้ ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 สำเร็จรูปทางอิมมูโนวิทยา (E.coli O157 immunoassay) ของ Tecra	22

สารบาญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างอี.โคไล โอ157แอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธี ELISA	5
รูปที่ 2 การวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra	18
รูปที่ 3 แผ่นเปรียบเทียบสีมาตรฐาน	18
รูปที่ 4 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ อี.โคไล โอ157 โดยวิธีต่างๆ	23

1. คำนำ

เอสเชอริเชีย โคไล หรือ อี. โคไล เป็นบักเตรีที่พบในลำไส้ของคน และสัตว์ ส่วนใหญ่การได้รับจุลินทรีย์ชนิดนี้เข้าไป จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ และทำให้ถึงตายได้ ตัวอย่างเช่น อี.โคไล โอ157 : เอช7 การเรียก โอ157 : เอช7 มาจากสารประกอบเคมีเฉพาะซึ่งพบที่ผิวของเชื้อชนิดนี้ [17,19]

อี.โคไล โอ157 : เอช7 เป็นบักเตรีที่เป็นสาเหตุของโรคถ่ายอุจจาระเป็นเลือด (haemorrhagic colitis) และเลือดออกในปัสสาวะ (haemolytic uremic syndrome) [2,3,7,8,9,12,16,19,20] สามารถติดต่อจากสัตว์สู่สัตว์ จากสัตว์สู่คน และจากคนสู่คนได้ [15] การระบาดของโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหารส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการบริโภคเนื้อวัวสดบดที่ปรุงไม่สุก หรือการดื่มนมดิบ [8,9,12,14,19]

สมบัติของอี.โคไล โอ157 : เอช7

อี.โคไล โอ157 : เอช7 เป็นบักเตรีที่ติดสีกรัมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ ซึ่งเหมือน อี.โคไลทั่วไป แต่มีสมบัติที่แตกต่างกันคือ อี.โคไล โอ157 : เอช7 ไม่สร้างเอนไซม์กลูคิวโรนิเดส (glucuronidase) และไม่สามารถย่อยน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) [7,9,12,14,17,19,20]

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของอี.โคไล โอ157 : เอช7

อี.โคไล โอ157 : เอช7 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 8 - 44 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส [19] บักเตรีชนิดนี้ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส [7,9,20] การใช้ความร้อน 70 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า สามารถทำลายเชื้อนี้ได้ [17,19]

การสร้างสารพิษ

อี.โคไล โอ157 : เอช7 สร้างสารพิษที่เรียกว่า เวอโรทอกซิน (verotoxin) หรือเรียกว่า ไชกา-ไลค์-ทอกซิน (Shiga-like toxin) เนื่องจากคล้ายสารพิษที่สร้างโดยเชื้อชิเจลลา ดีเซนทิรเอ (*Shigella dysenteriae*) เวอโรทอกซินมีสองชนิด คือ วีที 1 (VT1) และ วีที 2 (VT2) [18] สารพิษเหล่านี้มีพิษสูง นอกจากทำให้เกิดอาการอุจจาระ

เป็นเลือดแล้ว ยังทำให้เกิดอาการไตล้มเหลวเฉียบพลันในเด็ก และรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ [17,19]

การทนต่อสภาพแวดล้อม

อี.โคไล โอ157 : เอช7สามารถทนต่อสภาพเยือกแข็งได้ [19,20] ทนกรดได้ดีกว่าอี.โคไลสายพันธุ์อื่น ไม่สามารถเจริญได้ที่มีเกลือร้อยละ 8.5 เจริญได้น้อยที่ปริมาณเกลือร้อยละ 6.5 [19] ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการเจริญของ อี.โคไล โอ157 : เอช7 กล่าวคือการเจริญของบักเตรีจะลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาพไม่มีออกซิเจน และเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของเบรน ฮาร์ท อินฟิวชั่นมากกว่า 5.5 ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจะทำให้อัตราการเจริญของอี.โคไล โอ157 : เอช7ลดลง [2]

การระบาดของเชื้ออี.โคไล โอ157 : เอช7

ปีพ.ศ.2525 (ค.ศ.1982) พบการระบาดครั้งแรกของเชื้อ อี.โคไล โอ157 : เอช7 ที่รัฐมิชิแกน และ โอเรกอน สหรัฐอเมริกา สาเหตุมาจากการบริโภคแฮมเบอร์เกอร์ที่ปรุงไม่สุก [1,7,19,20] หลังจากนั้นก็มีการระบาดของเชื้อนี้อีกหลายครั้ง เช่น การระบาดครั้งใหญ่ในปีพ.ศ.2536 (ค.ศ.1993) ที่มลรัฐวอชิงตัน ไอดาโฮ และเนวาดา มีผู้ป่วยมากกว่า 400 คน และเด็กถึงแก่ความตาย 3 คน มีสาเหตุมาจากการบริโภคแฮมเบอร์เกอร์ที่ปรุงไม่สุก และพบการปนเปื้อนของเชื้อ อี.โคไล โอ157 : เอช7 [1,17,20] ประมาณกลางปี พ.ศ. 2539 ก็มีการระบาดของเชื้อชนิดนี้อีกในประเทศญี่ปุ่น มีผู้ป่วยจำนวนมาก และมีผู้เสียชีวิตด้วยซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเด็ก ส่วนสาเหตุยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ก็สงสัยว่าอาจเกิดจากการบริโภคปลาไหล มีรายงานว่าเมื่อต้นปีพ.ศ.2540 ในญี่ปุ่นได้มีผู้ป่วยที่เกิดจาก อี.โคไล โอ157 : เอช7 สูงถึง 10,000 คน และเสียชีวิตอีก 12 คน (มติชนรายวัน วันที่ 27 มิถุนายน 2540) เมื่อเดือนสิงหาคม 2540 ก็มีการระบาดของเชื้อนี้ในสหรัฐอเมริกาอีก สาเหตุมาจากการบริโภคแฮมเบอร์เกอร์ที่ไม่สุก จนเจ้าหน้าที่สหรัฐอเมริกาสั่งให้ปิดโรงฆ่าสัตว์ชั่วคราว นอกจากนี้ยังพบการระบาดของจุลินทรีย์ชนิดนี้ในออสเตรเลีย แคนาดา อังกฤษ ยุโรปตะวันตก และ แอฟริกาใต้ [17,19]

แหล่งของเชื้ออี.โคไล โอ157 : เอช7

โดยทั่วไปพบเชื้อนี้ในคน และสัตว์ เช่น วัว ควาย [1,17] นอกจากนี้ยังปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อวัวสดบดที่ปรุงไม่สุก นมดิบ แฮมเบอร์เกอร์ ไส้กรอก โยเกิร์ต ผัก น้ำ และน้ำแอปเปิ้ล [1,15,17,19,20]

อาการของโรค

โรคที่เกิดจากอี.โคไล โอ157 : เอช7ได้แก่

1.โรคถ่ายอุจจาระเป็นเลือด ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเดิน ถ่ายเป็นเลือด ปวดท้อง หลังจากได้รับเชื้ออี.โคไล โอ157 : เอช7 ภายในเวลา 3 ถึง 8 วัน และอาจทำให้ถึงตายได้โดยเฉพาะผู้สูงอายุ [1,17,19,20]

2.โรคเลือดออกในปัสสาวะ ผู้ป่วยจะมีอาการอาเจียน ซีดขาว ไตวายเฉียบพลัน เม็ดเลือดแดงต่ำ และเกล็ดเลือดต่ำ ระยะเวลาเกิดโรค 4 วัน ถึง 2 สัปดาห์ [1,17,18,19,20]

วิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 : เอช7 ในตัวอย่างอาหาร

การใช้วิธีวิเคราะห์เพื่อหาอี.โคไลทั่วไปในอาหาร ไม่สามารถตรวจหาอี.โคไล โอ157 : เอช7ได้ โดยทั่วไปจึงใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ (sorbitol MacConkey agar) [6,13,19] หรือซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ ที่เติม 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินดอกซิล-บีตา-ดี-กลูคิวโรนิค แอซิด ไซคลอเฮกซิล แอมโมเนียม ซอลท์ (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt) [13] อี.โคไล โอ157 : เอช7ไม่ย่อยซอร์บิทอล จะปรากฏโคโลนีสีขาวหรือไม่มีสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ เช่นเดียวกับการเติม 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินดอกซิล-บีตา-ดี-กลูคิวโรไนด์ ปริมาณ 0.1 กรัมในแมคคอนกี้ ซอร์บิทอล อะการ์ 1 ลิตร จะช่วยในการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 : เอช7 โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเบต้า-กลูคิวโรนิเดสจะมีสีฟ้า ซึ่งเห็นได้ชัดเจนกว่าการใช้แมคคอนกี้ ซอร์บิทอล อะการ์ ที่ไม่ได้เติมสารนี้ [10]

นอกจากนี้ยังมีวิธีทดสอบทางอิมมูโนวิทยาซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนของเชื้อนี้ วิธีนี้ค่อนข้างเฉพาะกับอี.โคไล โอ157 วิธีที่อาศัยหลักการนี้ได้แก่

1.วิธีที่ใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งทางองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาได้แนะนำไว้ในปีค.ศ. 1992 [6]

2.วิธี enzyme linked immunosorbent assay หรือ ELISA มีหลายบริษัทได้ผลิตชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ออกมาจำหน่ายโดยใช้หลักการของ ELISA คือ อาศัยปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีเอนไซม์บางชนิดจับอยู่ หลังจากนั้นก็เติมสารที่ไปจับกับเอนไซม์ แล้วเติมสารที่ทำให้เกิดสี (รูปที่ 1) การสร้างสีขึ้นมาทำให้สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า หรือจะใช้เครื่องอ่านสีก็ได้ ตัวอย่างชุดทดสอบ[13,20]ได้แก่

- EHEC-Tek enzyme-linked immunosorbent assay test kit ผลิตโดย Organon Teknika Corp., Durham, N.C., U.SA.

- AMPCOR dipstick ผลิตโดย AMPCOR Inc., Camden, N.J., U.S.A.

- Petrifilm Test Kit HEC ผลิตโดย 3M, St.Paul, Minn., U.S.A.

-TECRA E.COLI O157 VISUAL IMMUNOASSAY ผลิตโดย Bioenterprises Pty. Ltd. , N.S.W., Australia

วิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นการตรวจหาอี.โคไล โอ157 ในอาหารซึ่งใช้เวลาเร็วที่สุด 24 ชั่วโมง สำหรับผลลบ และนานถึง 6 วัน สำหรับยืนยันผลบวก ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะวินิจฉัยการปนเปื้อนของ อี.โคไล โอ157ในขั้นตอนการผลิต วิธีการที่ดีที่สุดคือการป้องกันไม่ให้เชื้อนี้ปนเปื้อนเข้าไปในอาหาร [20]

การป้องกันโรคที่เกิดจากอี.โคไล โอ157 : เอช7

มีหลายวิธีที่สามารถป้องกันไม่ให้ได้รับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ [15,17,20] เช่น

1.การใช้ระบบ HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)ในขั้นตอนการเลี้ยงสัตว์ และการฆ่าสัตว์ เพื่อเป็นการลดปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์

2.รีบเก็บเนื้อที่ซื้อจากตลาดไว้ในช่องแข็งทันที จนกว่าจะนำมาปรุงอาหาร

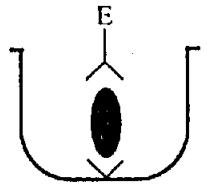
3.ทำให้เนื้อสัตว์สุกก่อนรับประทาน โดยใช้ความร้อนสูงกว่า 160 องศาฟาเรนไฮต์ จนกระทั่งตรงกลางชิ้นเนื้อไม่มีสีชมพู

4.ล้างผักและผลไม้ให้สะอาดก่อนรับประทาน และก่อนนำมาปรุงอาหาร

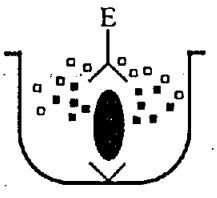
1. แอนติบอดีที่จำเพาะกับอี.โคไล โอ157 เคลือบติดกับหลุมทดสอบ

2. หากพบอี.โคไล โอ157 แอนติเจนในตัวอย่าง จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สิ่งอื่นซึ่งไม่ใช่อี.โคไล โอ157 แอนติเจนจะถูกล้างออกไป

3. เติมแอนติบอดีที่จำเพาะกับอี.โคไล โอ157 ซึ่งปลายข้างหนึ่งยึดกับเอนไซม์ (conjugate)



4. หลังจากเติม substrate เอนไซม์จะเปลี่ยน substrateให้เป็นสี



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาระหว่างอี.โคไล โอ157แอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธี ELISA

5.ล้างมือหลังจากออกจากห้องสุขาทุกครั้ง ก่อนปรุงอาหาร และก่อนรับประทานอาหาร

6.ล้างภาชนะที่สัมผัสกับเนื้อดิบ หรือน้ำของเนื้อดิบให้สะอาด และไม่นำภาชนะหรือเครื่องใช้ที่ใช้กับอาหารดิบมาใส่อาหารสุกโดยไม่ล้างเสียก่อน

7.ไม่วางอาหารดิบให้ปนกับอาหารสุก เพราะจะทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารดิบไปปนเปื้อนกับอาหารที่ทำเสร็จแล้ว

8.ดื่มนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเท่านั้น เนื่องจากมีการรายงานว่าพบอี.โคไล โอ157 : เอช7 ในน้ำนมดิบ

9.ดื่มน้ำที่สะอาด หากไม่แน่ใจควรนำมาต้มก่อน

10.เมื่อออกไปรับประทานอาหารนอกบ้าน ควรเลือกแต่อาหารที่ปรุงสุกแล้วเท่านั้น ไม่ควรรับประทานอาหารที่ดิบๆสุกๆ จะทำให้ร่างกายได้รับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ง่าย ไม่แต่เพียงอี.โคไล โอ157 : เอช7เท่านั้น ยังอาจได้รับเชื้อตัวอื่นอีกด้วย หากพบว่าอาหารที่ร้านใดปรุงไม่สุก มีน้ำสีชมพูอยู่ ควรให้นำไปปรุงใหม่

ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการแพร่ระบาดของเชื้ออี.โคไล โอ157 ในประเทศไทย และทางกลุ่มงานจุลชีววิทยายังไม่เคยทำการวิเคราะห์บักเตรีชนิดนี้ในตัวอย่างอาหาร การศึกษาทดลองครั้งนี้จึงเป็นการเก็บรวบรวมข้อมูลไว้เพื่อประโยชน์ในอนาคต

ในการศึกษาทดลองในครั้งนี้เป็นการตรวจการปนเปื้อนของอี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบด โดยการเปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยอี.โคไล โอ157 3 วิธี เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมและรวดเร็วในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในเนื้อวัวสดบด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 ในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด
2. เพื่อหาวิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ที่ถูกต้อง สะดวก และ รวดเร็ว

ระยะเวลาการดำเนินงาน

รวม 10 เดือน ตั้งแต่ ตุลาคม 2539 - กรกฎาคม 2540

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. นำวิธีที่เหมาะสมมาใช้ในการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 ของกลุ่มงานจุลชีววิทยาต่อไป
2. เฝ้าระวังการปนเปื้อนของอี.โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบด
3. ทำให้ผู้บริโภคระมัดระวังการบริโภคเนื้อวัวสดบด

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

ตัวอย่างเนื้อวัวสดบดจากตลาด และซุปเปอร์มาร์เก็ต ทั่วกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จำนวน 20 ตัวอย่าง อย่างน้อยตัวอย่างละ 200 กรัม นำมาเก็บในกระติกน้ำแข็งที่ปิดสนิทซึ่งบรรจุน้ำแข็ง 1 กิโลกรัมต่อภาชนะ 1 ลูกบาศก์ฟุต แล้วนำไปที่ห้องปฏิบัติการ เมื่อถึงห้องปฏิบัติการแล้วนำไปวิเคราะห์ทันที หากยังไม่วิเคราะห์ นำตัวอย่างไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการวิเคราะห์นำตัวอย่างออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส มาไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 5 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 18 ชั่วโมงแล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีที่ 1, 2 และ 3

รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบดจากตลาดสด และซุปเปอร์มาร์เก็ตใน กรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดที่มาของตัวอย่างเนื้อวัวสดบด

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา	เดือนปีที่เก็บตัวอย่าง
1	โรบินสัน สาขาถนนรัชดาภิเษก	มกราคม 2540
2	ตลาดบางเขน	มกราคม 2540
3	โรบินสัน สาขาดอนเมือง	มกราคม 2540
4	เซ็นทรัล สาขารามอินทรา	มกราคม 2540
5	ซันนี่ส์ สาขาเสนานิคม	กุมภาพันธ์ 2540
6	เซ็นทรัล สาขาแฟชั่นไอส์แลนด์	กุมภาพันธ์ 2540
7	ตลาดนนทบุรี	มีนาคม 2540
8	ดีโป้ สาขารังสิต	มีนาคม 2540
9	คาร์ฟูร์ สาขาถนนสุขาภิบาล 3	มีนาคม 2540
10	เซ็นทรัล สาขาวังบูรพา	มีนาคม 2540
11	ตลาดวงเวียนใหญ่	มีนาคม 2540
12	โรบินสัน สาขาลาดหญ้า	มีนาคม 2540
13	เดอะมอลล์ สาขาบางกะปิ	มีนาคม 2540
14	โรบินสัน สาขาถนนศรีนครินทร์	มีนาคม 2540
15	สยามจัสโก้ สาขาถนนรัตนาธิเบศร์	เมษายน 2540
16	เซยู สาขาซอยโชคชัย 4	เมษายน 2540
17	เซ็นทรัล สาขาลาดพร้าว	พฤษภาคม 2540
18	ฟู้ดแลนด์ สาขาถนนเพชรบุรีตัดใหม่	พฤษภาคม 2540
19	อิมพีเรียล สาขาสำโรง	พฤษภาคม 2540
20	โรบินสัน สาขาบางแค	พฤษภาคม 2540

2. เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ - 20 ± 1 องศาเซลเซียส

2.2 ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิ ตั้งแต่ – 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส ในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส และ 42 ± 1 องศาเซลเซียส

2.3 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (hot air oven) ควบคุมอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 220 องศาเซลเซียส ในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิ 170 ถึง 180 องศาเซลเซียส

2.4 หม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ควบคุมอุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส

2.5 เครื่องนับโคโลนี (colony counter)

2.6 หลอดอัลตราไวโอเลต (uv lamp) ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2.7 ถุงที่มีที่กรองซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (steriled filter stomacher bag)

2.8 เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.01 กรัม

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ (sorbitol MacConkey agar) ของ Oxoid

3.2 ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ (fluorocult E. coli O157 : H7 agar) ของ Merck

3.3 ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck

3.4 อีซีบรอทซึ่งเติมโนโวไบโอซิน (modified EC broth with novobiocin or mEC + n) ใช้ EC broth ของ Difco และ novobiocin ของ Merck

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดอยู่ในภาคผนวก

4. สารละลายสำหรับเจือจาง

ใช้สารละลายเพปโทนร้อยละ 0.1 บรรจุในขวดและหลอดทดลองฝาเกลียว ปริมาตร 90 และ 9 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. ชุดทดสอบสำเร็จรูป

5.1 ชุดทดสอบลาเท็กซ์สำหรับ อี.โคไล โอ157 (E.coli O157 latex test) ของ Oxoid

5.2 ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157ทางอิมมูโนวิทยา (E.coli O157 immunoassay) ของ Tecra ประกอบด้วย

1) น้ำยาล้างเข้มข้น (wash concentrate) ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาล้าง (washing solution) โดยเจือจางน้ำยาล้างเข้มข้น 1 ขวดด้วยน้ำกลั่น 2 ลิตร

2) positive control ก่อนใช้เติม control diluent ลงไปในหลอด positive control ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3) control diluent ที่เหลือจากการเตรียม positive control จะใช้เป็น negative control

4) conjugate และ conjugate diluent ก่อนใช้เท conjugate diluent ลงในหลอด conjugate

5) substrate และ substrate diluent ก่อนใช้เท substrate diluent ลงในหลอด substrate

6) sample additive

7) stop solution

8) หลุมที่เคลือบด้วยแอนติบอดี (antibody-coated wells) และที่ยึดหลุม (well holder)

9) แผ่นเทียบสี

6. วิธีวิเคราะห์อี.โคไล โอ157

6.1 วิธีที่ 1 เป็นการดัดแปลงวิธีของ FDA (1992) [6] ซึ่งวิธีของ FDA (1992) ใช้สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เนื่องจากในเนื้อวัวสดบดมีจุลินทรีย์หลายชนิดและบางชนิดสร้างโคโลนีที่แผ่กระจาย ดังนั้นการใช้สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อ ทำให้ยากต่อการดูผลการทดลอง อาจทำให้ผลที่ได้ผิดพลาด ในการศึกษาทดลองนี้จึงใช้สารละลายตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อ จานละ 0.1 มิลลิลิตรดังนี้

1) ใช้ช้อนซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างโดยชั่งมา 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายสำหรับเจือจาง 90 มิลลิลิตร เขย่าขึ้นลงอย่างรวดเร็ว 25 ครั้ง จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 ต่อ 10 ทำให้เจือจางต่อไปเรื่อยๆ โดยใช้สารละลายความเข้มข้นที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 ต่อ 100 และ 1 ต่อ 1 000 ตามลำดับ

2) ปิเปตสารละลายที่มีความเจือจาง 1 ต่อ 10, 1 ต่อ 100 และ 1 ต่อ 1 000 จำนวน 3 ความเข้มข้น ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ ความเข้มข้นละ 3 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร

3) ใช้แท่งแก้วโค้งงอ ซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4) กลับจานเพาะเชื้อ นำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง

5) นับจำนวนโคโลนีสีขาว ซึ่งเป็นบักเตรีที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอล เปรียบเทียบกับโคโลนีสีชมพูเข้มของบักเตรีที่ใช้น้ำตาลซอร์บิทอล การนับจำนวนโคโลนีใช้เครื่องนับโคโลนีที่มีแว่นขยายและแสงสว่างช่วย นับในจานเพาะเชื้อที่มี 30 – 300 โคโลนี นับทั้ง 3 จาน หาค่าเฉลี่ย คำนวณดังสูตรในข้อ 6)

6) จำนวนบักเตรีคำนวณดังนี้

จำนวนบักเตรี (โคโลนี/กรัม)

= ค่าเฉลี่ยของบักเตรีทั้ง 3 จาน X ไดลูชันแฟกเตอร์ X 10

7) นำเชื้อจากโคโลนีสีขาวที่มีลักษณะเหมือนกันจากข้อ 5) มาอย่างน้อย 3 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ทดสอบต่อด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์

8) การทดสอบด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์ ทำโดยเขี่ยเชื้อที่สงสัยลงบนแผ่นกระดาษทดสอบ แล้วหยดลาเท็กซ์สำหรับทดสอบลงไป ซึ่งลาเท็กซ์สำหรับทดสอบนี้จะตกตะกอนกับอี.โคไล โอ157เท่านั้น

9) เชื้อที่ให้โคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ และตกตะกอนด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์ คือ อี.โคไล โอ157

6.2 วิธีที่ 2 ใช้วิธีของ Pawelzik (1991) [14] แต่ไม่ได้ใช้เครื่องบด (stomacher) บดตัวอย่างเนื้อวัวสดนาน 1 นาทีในการเตรียมตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างทุกตัวอย่างได้บดมาแล้ว วิธีที่ 2 ทำดังนี้

1) ใช้ช้อนซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างโดยชั่งมา 25 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุลอริลซัลเฟตบรอท 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2) นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16 ถึง 24 ชั่วโมง

3) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ จำนวน 3 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร

4) ใช้แท่งแก้วโค้งงอ ซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) กลับจานเพาะเชื้อ นำไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16 ถึง 24 ชั่วโมง

6) นำจานเพาะเชื้อมาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดย อี.โคไล โอ157 จะสร้างโคโลนีสีเขียว และไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

6.3 วิธีที่ 3 เป็นวิธีของชุดทดสอบอี.โคไล โอ157สำเร็จรูปของ Tecra ประเทศออสเตรเลีย ดังนี้

1) ใช้ช้อนซึ่งอบฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างโดยชั่งมา 25 กรัม ใส่ลงถุงที่มีที่กรองซึ่งบรรจุอีซีบรอทซึ่งเติมโนโวไบโอซิน 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2) นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง

3) นำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA ดังนี้

- ปิเปตตัวอย่างในข้อ 2) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม sample additive 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้ม 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น
- เตรียมหลุมสำหรับทดสอบ โดยดึงออกจากถุง แล้วนำไปใส่ตัวยึด (well holder)
- ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้างบน(ตัวอย่างซึ่งเติม sample additive หลังจากต้มแล้ว) positive control และ negative control ใส่ลงในแต่ละหลุมๆละ 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพลาสติก นำไปอบที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- เทของเหลวในหลุมทดลองทิ้ง ล้างด้วยน้ำยาล้าง 3 ครั้ง
- เติม conjugate 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ปิดด้วยพลาสติก นำไปอบที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- เทของเหลวในหลุมทดลองทิ้ง ล้างด้วยน้ำยาล้าง 4 ครั้ง
- เติม substrate 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 - 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที จะเกิดสีเขียวขึ้นในหลุมที่ให้ผลบวก รวมทั้งหลุมที่ใส่ positive control ด้วย
- เติม stop solution 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

– อ่านผลโดยเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสี (colour card) หลุมที่ให้ผลบวกจะให้สีเขียว แสดงว่าตัวอย่างนั้นพบอี.โคไล โอ157

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

3. ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้วิเคราะห์หาอี.โคไล โอ157 โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 3 วิธี คือ

- วิธีที่ 1 ทำตามข้อ 6.1 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3
- วิธีที่ 2 ทำตามข้อ 6.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4
- วิธีที่ 3 ทำตามข้อ 6.3 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

การทดลองโดยใช้วิธีที่ 1 ดังในตารางที่ 2 พบว่าในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด มีทั้งบักเตรีที่สามารถใช้ซอร์บิทอล และบักเตรีที่ไม่สามารถย่อยซอร์บิทอลได้ ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองจำพวกสามารถเจริญได้บนอาหารซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ สำหรับจำนวนบักเตรีซึ่งสามารถย่อยซอร์บิทอลได้มีตั้งแต่ 90 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (พบในตัวอย่างที่ 10) จนถึง 3.0×10^5 โคโลนีต่อกรัมในตัวอย่างที่ 15 บักเตรีที่ไม่สามารถย่อยซอร์บิทอลได้พบตั้งแต่ 80 โคโลนีต่อกรัมในตัวอย่างที่ 1 ถึง 6.3×10^4 โคโลนีต่อกรัมในตัวอย่างที่ 15 หลังจากนั้นจึงนำเอาแต่จุลินทรีย์ที่มีสีขาวบนซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ ไปทดสอบด้วยชุดทดสอบลาเท็กซ์ สำหรับ อี.โคไล โอ157 ผลปรากฏในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าจากการวิเคราะห์เนื้อวัวสดบด 20 ตัวอย่าง พบอี.โคไล โอ157 ถึง 3 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 15 ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด

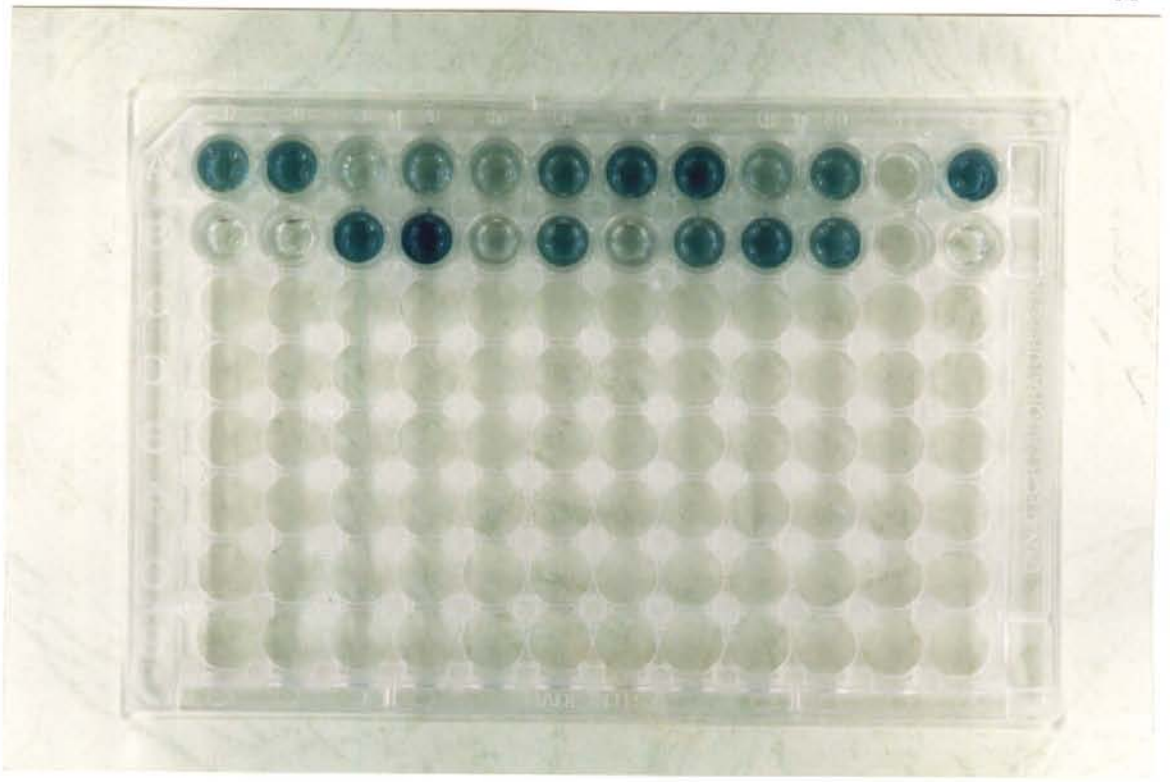
สำหรับวิธีที่ 2 ผลปรากฏในตารางที่ 4 พบว่า การวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อวัวสดบดทั้ง 20 ตัวอย่าง ไม่พบอี.โคไล โอ157เลย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่มีโคโลนีสีดำและเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ยกเว้นในตัวอย่างที่ 4 พบโคโลนีสีเขียว แต่เรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ ถ้าเป็นอี.โคไล โอ157 จะให้โคโลนีสีเขียว และไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตซึ่งจะแตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัด

วิธีที่ 3 วิธีนี้อี.โคไล โอ157 จะจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ในหลุมทดสอบ แล้วเติมแอนติบอดีที่มีเอนไซม์ (conjugate) ลงไป แล้วจึงเติมสารเริ่มต้น (substrate) ลงไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือเอนไซม์จะทำให้สารเริ่มต้นเปลี่ยนเป็นสีเขียว ดังแสดงในรูปที่ 2 แถวบนขวามือสุด ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของตัวควบคุมที่เป็นบวก (positive control) หากไม่มีอี.โคไล โอ157 หรือถ้ามีจุลินทรีย์ชนิดอื่นในตัวอย่าง จะไม่มีการจับตัวกันระหว่างจุลินทรีย์กับแอนติบอดี และเมื่อถึงขั้นตอนการล้าง จะไม่มีอะไรเหลืออยู่ในหลุมทดสอบอีกเลย เมื่อ

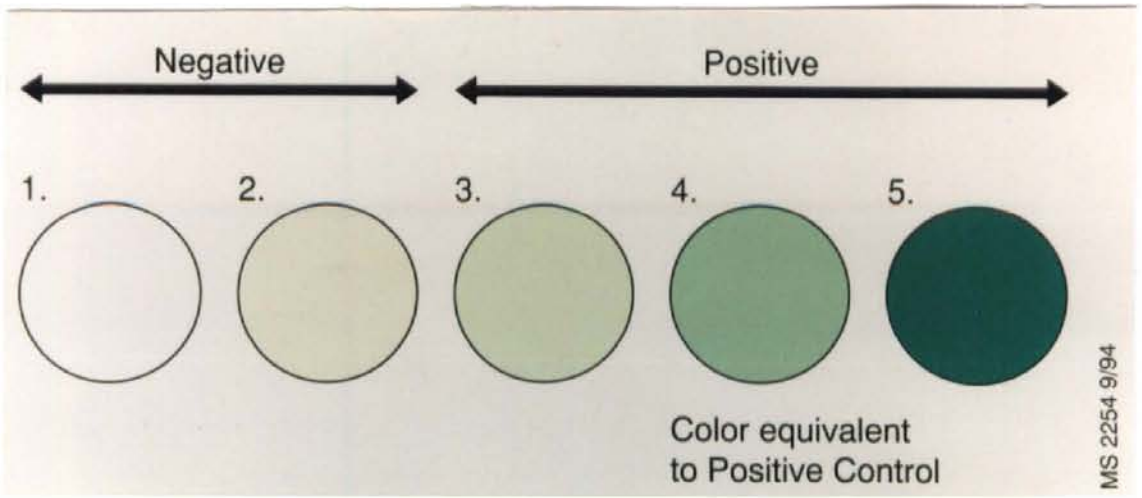
เติมสารเริ่มต้นในขั้นสุดท้าย จะไม่มีปฏิกิริยาใดๆเกิดขึ้น จึงไม่มีการเปลี่ยนสีของสารเริ่มต้นเป็นสีเขียว ดังจะเห็นตัวอย่างได้ในแถวที่สอง หลุมสุดท้ายขวามือในรูปที่ 2 ซึ่งเป็นตัวควบคุมที่เป็นลบ (negative control) สำหรับเนื้อวัวสดบดที่วิเคราะห์ ผลที่ได้ดังในรูปที่ 2 เปรียบเทียบสีกับแผ่นสีมาตรฐานในรูปที่ 3 ได้ผลสุดท้ายดังในตารางที่ 5 ซึ่งแสดงว่าพบอี.โคไล โอ157 มากถึง 13 ตัวอย่างจากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็นร้อยละ 65

ผลการทดลองเปรียบเทียบการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 ทั้ง 3 วิธี ดังแสดงในรูปที่ 4 เห็นว่าวิธีที่ 2 วิธีเดียวที่ไม่พบอี.โคไล โอ157 แต่วิธีที่ 1 และ 3 ก็ให้ผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้จากการทดลอง ยังพบว่าแต่ละวิธีอาจเกิดความผิดพลาดในแต่ละขั้นตอนของการทดลองได้ โดยวิธีที่ 1 หากเลือกโคโลนีสีขาวที่ไม่ใช่ตัวแทนของอี. โคไล โอ157 มาทดสอบ อาจทำให้ผลที่ได้ผิดไป วิธีที่ 2 อาจดูการไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตของอี. โคไล โอ157ผิดพลาด เนื่องจากบักเตรีชนิดอื่นซึ่งเรืองแสงและเจริญได้ดีกว่า สำหรับวิธีที่ 3 มีความจำเพาะกับอี. โคไล โอ157 มากกว่า 2 วิธีแรก แต่ก็ต้องระวังเรื่องชุดน้ำยาทดสอบ โดยทำ control ควบคู่ไปด้วย



รูปที่ 2 การวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra



รูปที่ 3 แผ่นเปรียบเทียบสีมาตรฐาน

ตารางที่ 2 จำนวนบักเตรีในเนื้อวัวสดบดที่เจริญบนซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์

ตัวอย่างที่	บักเตรีที่ใช้ซอร์บิทอล (โคโลนีสีชมพูเข้ม) โคโลนี/กรัม	บักเตรีที่ไม่ใช้ซอร์บิทอล (โคโลนีสีขาว) โคโลนี/กรัม
1	3.0×10^2	80
2	1.2×10^3	85
3	1.7×10^4	5.6×10^3
4	1.5×10^2	2.1×10^2
5	1.4×10^3	1.3×10^3
6	1.7×10^3	5.9×10^3
7	3.6×10^3	5.0×10^3
8	5.9×10^3	2.4×10^4
9	1.7×10^4	1.5×10^4
10	90	2.7×10^2
11	2.0×10^3	9.6×10^2
12	7.7×10^2	3.6×10^2
13	9.3×10^3	3.7×10^4
14	9.2×10^3	9.3×10^3
15	3.0×10^5	6.3×10^4
16	4.4×10^2	4.0×10^2
17	2.7×10^3	7.7×10^3
18	3.9×10^2	7.4×10^2
19	8.0×10^3	5.5×10^3
20	9.1×10^3	2.4×10^3

หมายเหตุ ในการนับจำนวนบักเตรี นับจากจานเพาะเชื้อความเข้มข้นต่างๆซึ่งมีโคโลนีอยู่ในช่วง 30 ถึง 300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ และนับจำนวนโดยใช้เครื่องนับโคโลนี

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบยืนยันอี.โคไล โอ157โดยใช้ชุดทดสอบลาเท็กซ์สำหรับ อี.โคไล โอ157

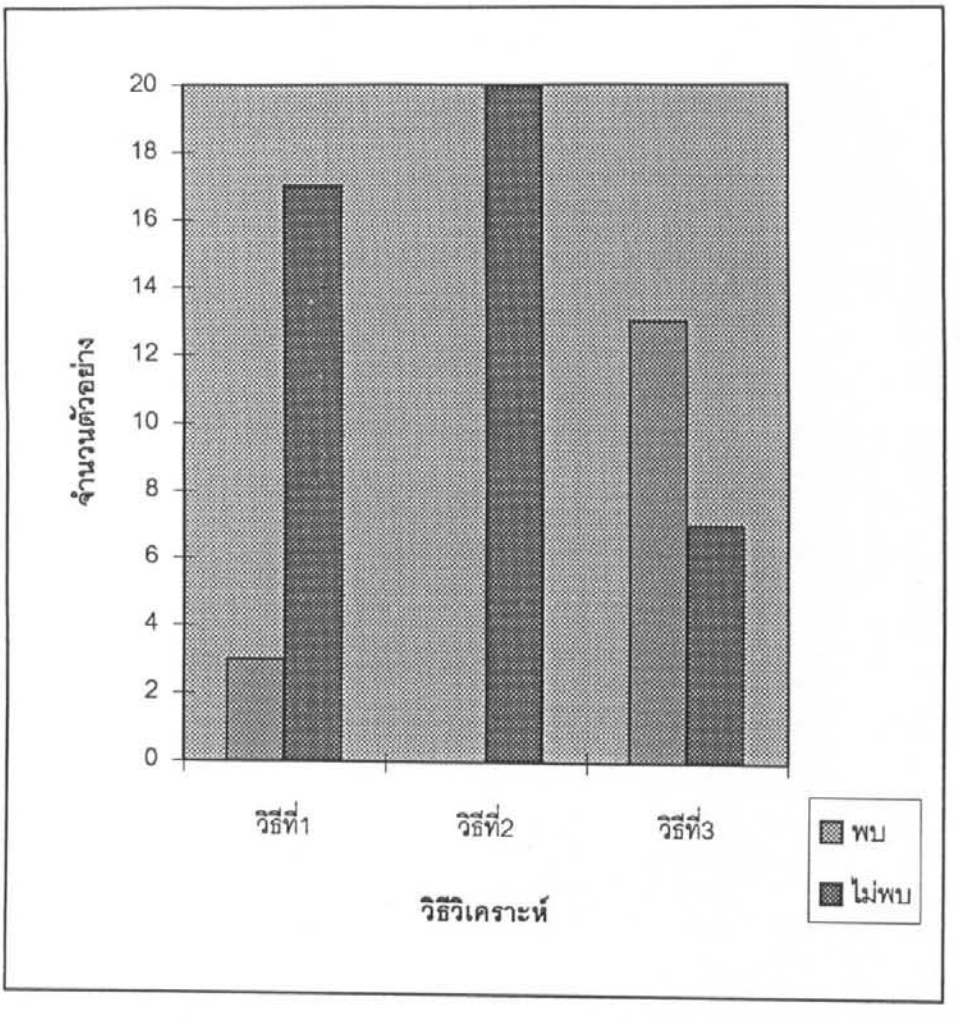
ตัวอย่าง	อี.โคไล โอ157
1	ไม่พบ
2	ไม่พบ
3	ไม่พบ
4	ไม่พบ
5	ไม่พบ
6	ไม่พบ
7	ไม่พบ
8	ไม่พบ
9	ไม่พบ
10	พบ
11	ไม่พบ
12	พบ
13	ไม่พบ
14	ไม่พบ
15	ไม่พบ
16	ไม่พบ
17	พบ
18	ไม่พบ
19	ไม่พบ
20	ไม่พบ

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบดโดยใช้ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์

ตัวอย่าง	ลักษณะของโคโลนี	อี.โคไล โอ157
1	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
2	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
3	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
4	เขียว เรืองแสง	ไม่พบ
5	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
6	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
7	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
8	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
9	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
10	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
11	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
12	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
13	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
14	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
15	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
16	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
17	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
18	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
19	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ
20	ดำ เรืองแสง	ไม่พบ

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157ในเนื้อวัวสดบดโดยใช้ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157สำเร็จรูป ทางอิมมูโนวิทยา (E.coli O157 immunoassay) ของ Tecra

ตัวอย่าง	อี.โคไล โอ157
1	พบ
2	พบ
3	ไม่พบ
4	พบ
5	ไม่พบ
6	พบ
7	พบ
8	พบ
9	ไม่พบ
10	พบ
11	ไม่พบ
12	ไม่พบ
13	พบ
14	พบ
15	ไม่พบ
16	พบ
17	ไม่พบ
18	พบ
19	พบ
20	พบ



รูปที่ 4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ อี.โคไล โอ 157 โดยวิธีต่าง ๆ

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า วิธีที่ 1ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ FDA (1992) [6] โดยใช้สารละลายตัวอย่างใส่จานเพาะเชื้อละ 0.1 มิลลิตร ซึ่งวิธีของ FDA (1992) ใช้สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร วิธีนี้แยกจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอล ออกจากจุลินทรีย์ที่ใช้ซอร์บิทอลเป็นอาหารได้ แต่ก็เป็นการยากที่จะแยกอี.โคไล โอ157 ออกจากบักเตรีที่ไม่สามารถย่อยซอร์บิทอลตัวอื่นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ต่างก็เจริญบนอาหารซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ และให้โคโลนีสีขาวเหมือนกัน ดังนั้นจึงทดสอบยืนยันโดยใช้ชุดทดสอบลาเท็กซ์สำหรับอี.โคไล โอ157 อย่างไรก็ตามไม่สามารถหาปริมาณของอี.โคไล โอ157ได้ด้วยวิธีนี้ วิธีนี้เป็นเพียงหาว่าในตัวอย่างนำมาวิเคราะห์พบอี.โคไล โอ157 หรือไม่

วิธีที่ 2 ใช้วิธีของ Pawelzik (1991) [14] แต่ไม่ใช้เครื่องบด (stomacher) บดตัวอย่างเนื้อวัวสดนาน 1 นาทีในการเตรียมตัวอย่าง วิธีนี้ไม่สามารถแยกอี.โคไล โอ157 ในตัวอย่างได้ เนื่องจากพบบักเตรีชนิดอื่นซึ่งอาจเจริญได้ดีกว่าบนอาหารฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ ทำให้อี.โคไล โอ157 ไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ชนิดอื่นยังอาจสร้างบีตา-ดี-กลูคิวโรนิเดส ซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หากพบจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญก็อาจไปบดบังพวกที่ไม่เรืองแสง ทำให้เข้าใจผิดว่ามีแต่บักเตรีที่สร้างเอนไซม์นี้เท่านั้น เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไม่ได้ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่อี.โคไล โอ157 ดังนั้นการใช้วิธีนี้จึงเป็นการยากที่จะหาอี.โคไล โอ157ในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด

วิธีที่ 3 เป็นวิธีทดสอบแบบรวดเร็วโดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีซึ่งเฉพาะเจาะจงกับอี.โคไล โอ157เท่านั้น วิธีนี้ง่าย และรวดเร็ว ใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 20 ชั่วโมงก็สามารถทราบผลได้ ผลที่ได้ออกมาก็ชัดเจน สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถแยกตัวอย่างที่ให้ผลบวกออกจากผลลบได้อย่างชัดเจน แต่ราคาของชุดทดสอบนี้ต่อตัวอย่างแพงมาก เมื่อเทียบกับวิธีที่ 1 และ 2

สำหรับการทดลองครั้งนี้พบว่าวิธีทั้งสามวิธีให้ผลแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะวิธีที่ 1 และ 2 ไม่จำเพาะกับอี.โคไล โอ157 จึงอาจพบบักเตรีชนิดอื่นซึ่งเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้งสองวิธีนั้น และอาจพบบักเตรีชนิดอื่นซึ่งมีลักษณะเหมือนกับอี.โคไล โอ157 จนทำให้ผลที่ออกมาผิดไป ส่วนวิธีที่ 3 มีความจำเพาะต่ออี.โคไล

โอ157มากกว่าสองวิธีแรก และโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยากับบักเตรีชนิดอื่นมีค่อนข้างน้อย วิธีที่ 3 จึงให้ผลที่น่าเชื่อมากกว่า

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ตัวอย่างเนื้อวัวสดบดที่วิเคราะห์ มีอี.โคไล โอ157 ปนเปื้อนอยู่ แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้วิเคราะห์ว่าเป็นอี.โคไล โอ157 : เอช7 หรือไม่ เนื่องจากอี.โคไล โอ157 เป็นบักเตรีกลุ่มใหญ่ซึ่งประกอบไปด้วยอี.โคไล โอ157 : เอช7 และ เอชอื่นๆ ซึ่งก็เป็นบักเตรีที่ทำให้เกิดโรคเหมือนกัน นอกจากนี้ แฟลกเจลลา แอนติเจน เอช7 จะสร้างขึ้นโดยบักเตรีอี.โคไล โอ157 เมื่อสภาวะแวดล้อมของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมเท่านั้น จึงเป็นการยากที่จะพบแอนติเจนชนิดนี้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเฉพาะอี.โคไล โอ157

5. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 ตัวอย่างเนื้อวัวสดบด 20 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 3 วิธี พบว่าวิธีที่ 3 ซึ่งเป็นชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra ให้ผลที่รวดเร็ว และชัดเจนกว่าวิธีอื่น แต่ราคาค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่างค่อนข้างแพง ดังนั้นในการวิเคราะห์อี. โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบดอาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ ที่เติมสารบางอย่างที่จะไปยับยั้งการเจริญของบักเตรีชนิดอื่น เช่น cefixime และ potassium tellurite หลังจากนั้นจึงนำโคโลนีของบักเตรี ที่สงสัยมาทดสอบต่อด้วยชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ที่มีจำหน่ายทั่วไป น่าจะเป็นการประหยัดได้มากกว่า แต่การวิเคราะห์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157 : เอช7 อะการ์ ให้ผลไม่น่าพอใจ ถึงแม้ว่าบักเตรีแต่ละชนิดจะสร้างสีของโคโลนีและเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่แตกต่างกัน แต่การที่มีบักเตรีชนิดอื่นซึ่งเรืองแสงเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จำนวนมาก อาจบดบังการไม่เรืองแสงของอี.โคไล โอ157 จึงไม่ควรนำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มาใช้กับตัวอย่างเนื้อวัวสดบด

จากการทดลองยังพบว่า วิธีที่ให้ผลดีในการวิเคราะห์อี.โคไล โอ157 ในตัวอย่างเนื้อวัวสดบด คือ วิธีที่ใช้ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ วิธีที่ใช้ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว เช่น ชุดทดสอบอี.โคไล โอ157 ของ Tecra เป็นต้น ซึ่งผู้ที่เกี่ยวข้องกับสุขลักษณะของเนื้อสัตว์สามารถเลือกวิธีที่เหมาะสมนำไปปฏิบัติ เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของอี.โคไล โอ157 ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายภายในประเทศ

การที่พบอี.โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบดที่จำหน่ายตามท้องตลาด ทำให้ต้องระวังในการบริโภคเนื้อสัตว์ทั้งหลาย ไม่เฉพาะเนื้อวัวเท่านั้น ควรบริโภคแต่เนื้อสัตว์ที่ทำให้สุกแล้วเท่านั้น เพราะอี.โคไลพวกนี้ไม่ทนความร้อน อย่างไรก็ดีบักเตรีเหล่านี้ยังอาจสร้างสารพิษอีกด้วย ดังนั้นการควบคุมการผลิตเนื้อสัตว์ไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ดีกว่าจะมาแก้ไขภายหลัง ควรดูแลตั้งแต่การเลี้ยงสัตว์ให้ถูกสุขลักษณะจนถึงการนำไปจำหน่ายต่อผู้บริโภค หากทำได้ดังนี้ก็จะช่วยให้เนื้อสัตว์ที่ผลิตภายในประเทศปลอดจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคทั้งหลาย

การทดลองนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับปศุสัตว์ การชำแหละและการผลิตเนื้อสัตว์ เพื่อให้ทราบถึงสภาวะการปนเปื้อนของอี.โคไล โอ157 ในเนื้อวัวสดบด และยังมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคอีกด้วย ทำให้ระมัดระวังมากยิ่งขึ้นในการปรุงอาหารและการบริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คุณวรรณี สมพร หัวหน้ากลุ่มงาน จุลชีววิทยา ที่ช่วยให้คำปรึกษา แนะนำ ขอขอบคุณคุณวิไลวรรณ สะตะมณี นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มงานจุลชีววิทยา ที่สนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Adams, M. R. and Moss, M. O. **Food Microbiology**. Redwood Books Ltd., Wiltshire, 1995.

2. Buchanan, R. L. and Klawitter L. A. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 **Food Microbiology** 9, 1992:185-196.

3. Chapman, P. A. and Siddons, C. A. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay (EHEC-Tek) for detecting *Escherichia coli.* O157 in beef and beef products **Food Microbiology** 13, 1996: 175-182.

4. Difco Manual Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10th ed. Difco Laboratories. Detroit Michigan, 1984.

5. E.Merck, Microbiology Manual, Darmstadt, 1996.

6. FDA, Bacteriological Analytical Manual 7TH edition Isolation Methods for Enterohemorrhagic E. coli (EHEC), FDA, Washington, DC, 1992.

7. Flint S. H. and Hartley N. J. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immunoassay for tests on dairy products **Letters in Applied Microbiology** 21, 1995:79-82.

8. Fratamico P. M., Schultz F. J. and Buchanan R. L. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of foods using an immunomagnetic separation method **Food Microbiology** 9, 1992:105-113.

9. Okrend A. J. G., Rose, B. E. and Bennett, B. A Screening Method for the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef **Journal of Food Protection** 53, 3, 1990:249-252.

10. Okrend A. J. G., Rose, B. E. and Lattuada C. P. Use of 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-β-D-Glucuronide in MacConkey Sorbitol Agar to Aid in the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef **Journal of Food Protection** 53, 11, 1990:941-943.

11. Oxoid, The Manual 7 th Edition, Hampshire, 1995.

12. Padhye N. V. and Doyle M. P. Rapid Procedure for detecting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Food **Applied and Environmental Microbiology** 57, 9, 1991:2693-2698.

13. Patel, P.D. **Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology** Blackie Academic & Professional, London, 1994.

14. Pawelzik, M. PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI O157 :H7 AND THEIR DETECTION **Acta Microbiologica Hungarica** 38 (3-4), 1991: 315-320.

15. United Stated Department of Agriculture, E.coli O157:H7 : What you need to know if there is an outbreak in your community, USDA, Food Safety and Inspection Service, Washington, DC, 1995.

16. จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์ อรุณี สาระยา และ มาลิน จุลศิริ การเปรียบเทียบวิธีการหา *E.coli* O157 : H7 ในเนื้อหมูบด **เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการ เรื่องโรคติดเชื้อจากอาหารและการจัดระบบเฝ้าระวังการดื้อยาของจุลชีพ** สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2539

17. นพมาศ สะพู อี.โคไล โอ157 : เอช7 (E.coli O157:H7) **วิทยาศาสตร์สำหรับประชาชน ครั้งที่ 545** กรมวิทยาศาสตร์บริการ กรุงเทพมหานคร 2540

18. ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 **เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง Pathogenic Bacteria and Future Impact on the Food Industry** Merck Ltd., Bangkok, 1995.

19. เพ็ญศรี รอดมา การตรวจสอบ *Escherichia coli* O157:H7 ในอาหาร **<u>เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการ เรื่องโรคติดเชื้อจากอาหารและการจัดระบบเฝ้าระวังการดื้อยาของจุลชีพ</u>** สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2539

20. สิริพร สธนเสาวภาคย์ ระวัง...อันตรายจาก *E.coli* O157 : H7 **<u>อาหาร</u>** 23, 4, 2536: 239 - 241.

ภาคผนวก

ภาคผนวกอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. ซอร์บิทอล แมคคอนกี้ อะการ์ (sorbitol macconkey agar) ของ Oxoid [11]

มีส่วนประกอบดังนี้		
เพปโทน (peptone)	20.0	กรัม
ซอร์บิทอล (sorbitol)	20.0	กรัม
ไบล์ซอลท์ (bile salts No.3)	1.5	กรัม
โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride)	5.0	กรัม
นิวทรัล เรด (neutral red)	0.03	กรัม
คริสตัล ไวโอเลต (crystal violet)	0.001	กรัม
วุ้น (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.1 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

2. ฟลูออโรคัลท์ อี.โคไล โอ157:เอช7 อะการ์ (fluorocult E. coli O157:H7 agar) ของ Merck [5]

มีส่วนประกอบดังนี้		
เพปโทน (peptone)	20.0	กรัม
มีทเอ็กซแทรกต์ (meat extract)	2.0	กรัม
ยีสต์เอ็กซแทรกต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5.0	กรัม
ซอร์บิทอล (sorbitol)	10.0	กรัม
โซเดียม ดีออกซีโคเลต (sodium deoxycholate)	1.12	กรัม
โซเดียม ไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	2.0	กรัม

เฟอร์ริก แอมโมเนียม ซิเตรต (ferric ammonium citrate III)	0.5	กรัม
4 เมทิลลัมเบลลิเฟอริล เบต้า ดี กลูคิวโรไนด์ (4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide)	0.1	กรัม
โบรโมไทมอล บลู (bromothymol blue)	0.025	กรัม
วุ้น (agar)	13.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 7.4 $\pm$ 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนละลาย บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนใช้

3. ลอริลซัลเฟตบรอท (lauryl sulfate broth) ของ Merck [5]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate)	2.75	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate)	2.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5.0	กรัม
แล็กโทส (lactose)	5.0	กรัม
โซเดียม ลอริล ซัลเฟต (sodium lauryl sulfate)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.8 $\pm$ 0.1 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. อีซีบรอทซึ่งเติมโนโวไบโอซิน (mEC + n) โดยใช้อีซีบรอทของ Difco [4] และโนโวไบโอซินของ Merck [5]

มีส่วนประกอบดังนี้

ทริปโทส (tryptose)	20.0	กรัม
แล็กโทส (lactose)	5.0	กรัม
ไบล์ซอลต์หมายเลข 3 (bile salts No. 3)	1.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	4.0	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (monopotassium phosphate)	1.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 6.9 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รอให้เย็น เติมสารละลายโนโวไบโอซิน (ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม / มิลลิลิตรซึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีกรองโดยใช้ แผ่นกรอง Gelman Sciences, Michigan ขนาด 0.2 ไมครอน) โดยเติมสารละลายโนโวไบโอซิน จำนวน 1.125 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 225 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 มิลลิกรัม / ลิตร