บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument., Germany

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

3. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

4. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland

5. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

7. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส (Lactobacillus broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

3. อาหารที เอส ไอ (TSI agar) ของบริษัท Oxoid, England

4. อาหารทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส (Urease agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

5. อาหารเลี้ยงเชื้อบิลเลียนกรีน Brilliant Green (BG) ของบริษัท Oxoid, England

6. อาหาร Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) ของบริษัท Oxoid, England

7. อาหารแข็งโครโมเคาท์โคลิฟอร์ม (Chromocult^{R} Coliforms Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

8. แอนติเจนซัลโมเนลลากลุ่ม B, C1, C2, D, E1, E4 ของบริษัท S&A Reagents Lab, Thailand

9. แอนติซีรัม A-67, A-I, B, C, D, E ของบริษัท S&A Reagents Lab, Thailand

3.3 จุลินทรีย์

1. *Lactobacillus* ssp. แยกได้จากลำไส้ไก่ จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร มีจำนวน 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือแกงเข้มข้น 5 % และเกลือน้ำดี 5 % ทั้ง 4 ชนิดดื้อต่อสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แวนโคมัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม และซัลฟาเมทาซีนความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในไก่และคนจากการทดลอง *in vitro test* ได้แก่ *Listeria monocytogenes* *Salmonella* Enteritidis *S.* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* รวมทั้งมีสมบัติเป็นโพรไบโอติกสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในไก่กระทงได้ ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้รับการยืนยันผลการศึกษาของการจำแนกกลุ่ม และชนิดซึ่งตรงกันกับการพิสูจน์เอกลักษณ์จาก MIRCEN กรุงเทพ ฯ (ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์, 2539)

2. *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.4 ประเมินประสิทธิภาพโพรไบโอติกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. การเจริญเติบโตของไก่โดยติดตามบันทึก
   - น้ำหนักไก่เฉลี่ยต่อตัว (กรัม)
   - อัตราการแลกเนื้อ : FCR : Feed Convertion Ratio = feed intake / weight
   - PI : Productive Index = (weight x % survival) / (FCR x age) x 100
   - ADG : Average Daily Gain = total weight / days of culture
   - การตายสะสม (%)
   - การกินอาหาร (gram of feed / chick)
2. ระบบภูมิต้านทานในไก่ศึกษาจาก
   - แอนติบอดีต่อ New castle virus
   - แอนติบอดีต่อ *Salmonella* spp.
   - ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว
3. ด้านจุลชีววิทยาศึกษาจาก
   - จุลินทรีย์ในน้ำดื่ม
   - จุลินทรีย์ในอาหารไก่
   - จุลินทรีย์มูลไก่
   - จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การทดลอง

3.5.1. ศึกษาข้อมูลพื้นฐาน และสภาวะแวดล้อมของไก่ก่อนทำการทดลองเลี้ยงไก่ผสมโพรไบโอติก

3.5.1.1 สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารไก่คละเบอร์ จำนวน 3 ตัวอย่างต่อเบอร์อาหาร ณ ฟาร์มเลี้ยง เพื่อศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น

3.5.1.2 สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำดื่มไก่ จุดละ 3 ตัวอย่าง ณ ปลายแนวท่อน้ำดื่มไก่ภายในโรงเรือนเลี้ยงไก่ เพื่อศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น

3.5.1.3 ตรวจแบคทีเรียในน้ำที่ผ่านการบำบัดด้วยคลอรีน ก่อนและหลังเติม *Lactobacillus* spp. แบบผสม 4 สายพันธุ์ในน้ำดื่มไก่ ณ ถังเก็บน้ำหน้าโรงเรือน โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 10^6 CFU/ml ณ โรงเรือนฟาร์มเลี้ยงไก่ระดับพาณิชย์ เพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. โดยตัวอย่างน้ำเก็บน้ำในถังก่อนการผสมโพรไบโอติก 1 ตัวอย่าง และเก็บน้ำหลังการผสมโพรไบโอติก ณ ตอนปลายแนวท่อส่งน้ำ 4 แนว แนวละ 1 ตัวอย่าง

3.5.1.4 ตรวจแบคทีเรียในน้ำก่อน และหลังเติม *Lactobacillus* spp. แบบผสม 4 สายพันธุ์ในน้ำดื่มไก่จากแหล่งน้ำบาดาล โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 10^6 CFU/ml ณ โรงเรือนทดลองทุ่งตาแก้วเพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ในแหล่งน้ำ เก็บน้ำ 3 ตัวอย่างต่อแหล่ง

3.5.1.5 สุ่มเก็บมูลไก่แต่ละช่วงอายุเพื่อศึกษาแบคทีเรียประจำถิ่น 3-5 ตัวอย่างต่อเล้าในแต่ละช่วงอายุ

3.5.1.6 สุ่มเจาะเลือดไก่แต่ละช่วงอายุเพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดไก่

3.5.2 การทดสอบภาคสนามเพื่อประเมินผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมในน้ำดื่มต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อพันธุ์ Cobb

3.5.2.1 การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมน้ำดื่มให้ไก่กินต่อการเจริญของไก่พันธุ์เนื้อ ระดับฟาร์มพาณิชย์ ณ โรงเรือนสหฟาร์มพัฒนา ฟาร์ม 1 เล้า 1, 2, 3, 11, 12, 13

ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb คละเพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 49 วัน จำนวน 116,640 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทสหฟาร์ม โดยแบ่งไก่เป็น 2 กลุ่มการทดลอง (Treatment) กลุ่มละ 3 เล้า เล้าละ 19,440 ตัว รวม 58,320 ตัวต่อกลุ่ม

กลุ่มที่1 คือ กลุ่มควบคุม ให้อาหารและน้ำปกติ ได้แก่ เล้า 1, 2, 3

กลุ่มที่2 คือ ไก่ที่ให้อาหารปกติ และน้ำที่เสริมโพรไบโอติก 10^6 CFU/ml ตลอดการทดลอง ได้แก่ เล้า 11, 12, 13

ทุกสัปดาห์ทำการทดสอบ

3.5.2.1.1 ตรวจปริมาณสารพิษ (ฝ่ายควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์บริษัทสหฟาร์ม) และปริมาณแบคทีเรียในอาหารไก่ ตรวจปริมาณสารพิษ 1 ตัวอย่างต่อเบอร์อาหาร ตรวจปริมาณแบคทีเรีย 3 ตัวอย่างต่อสัปดาห์

3.5.2.1.2 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำดื่ม และตรวจนับจำนวนเซลล์รอดชีวิตของ *Lactobacillus* sp. (10^6 CFU/ml) ที่ผสมในน้ำดื่มไก่ ก่อนการผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส 1 ตัวอย่าง จากถังหน้าโรงเรือน และหลังผสมแลคโตบาซิลลัสเก็บตัวอย่างน้ำตอนปลายแนวท่อส่งน้ำภายในโรงเรือน 4 แนว 1 ตัวอย่างต่อแนวท่อส่งน้ำ

3.5.2.1.3 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลไก่ เก็บมูลไก่ 3 ตัวอย่างต่อฟาร์ม

3.5.2.1.4 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างทางเดินอาหารไก่ในส่วน Duodenum Jejunum Ileum Cecum ที่อายุ 28 และ 49 วัน จากตัวอย่างไก่โรงเรือนละ 2 ตัวต่อช่วงอายุ จาก 3 โรงเรือนต่อกลุ่มการทดลอง

3.5.2.1.5 ติดตามการเจริญเติบโตของไก่จากการประเมินผลของ FCR, PI, ADG เปอร์เซ็นต์การตายสะสม, การกินอาหารสะสมต่อตัว, น้ำหนักตัว

3.5.2.2 การทดสอบภาคสนามเพื่อประเมินผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมน้ำดื่มให้ไก่กินต่อการเจริญเติบโตของไก่พันธุ์เนื้อ ในฟาร์มทดลองระดับ pilot scale ณ โรงเรือนทดลองสหฟาร์มพัฒนา

ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb คละเพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 49 วัน จำนวน 800 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทสหฟาร์มโดยแบ่งไก่เป็น 2 กลุ่มการทดลอง (Treatment) กลุ่มละ 8 กรง กรงละ 50 ตัว รวม 400 ตัวต่อกลุ่ม

กลุ่มที่1 คือ กลุ่มควบคุม ให้อาหารและน้ำปกติ

กลุ่มที่2 คือ ไก่ที่ให้อาหารปกติ และน้ำที่เสริมโพรไบโอติก 10^6 CFU/ml ตลอดการทดลอง

ทุกสัปดาห์ทำการทดสอบ

3.5.2.2.1 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารไก่ 3 ตัวอย่างต่อเบอร์อาหาร

3.5.2.2.2 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำดื่ม และตรวจนับจำนวนเซลล์รอดชีวิตของ *Lactobacillus* sp. (10^6 CFU/ml) ที่ผสมในน้ำดื่มไก่ เก็บน้ำจากแหล่งน้ำกลุ่มควบคุม 2 ตัวอย่าง และแหล่งน้ำไก่ที่ผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส 2 ตัวอย่าง

3.5.2.2.3 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลไก่ 4 ตัวอย่างต่อกลุ่มการทดลอง

3.5.2.2.4 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างทางเดินอาหารไก่ในส่วน Duodenum Jejunum Ileum Cecum ที่อายุ 21, 28, 35วัน จากตัวอย่างไก่กลุ่มการทดลองละ 4 ตัวต่อช่วงอายุ

3.5.2.2.5 สุ่มเจาะเลือดไก่ศึกษาแอนติบอดีต่อ *Salmonella* spp. 15 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง

3.5.2.2.6 ติดตามการเจริญเติบโตของไก่จากการประเมินผลของ FCR, ADG การกินอาหารเฉลี่ยต่อตัวต่อวัน น้ำหนักตัว

3.5.2.3 การประเมินผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมน้ำดื่มให้ไก่กินต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ในไก่พันธุ์เนื้อ ระดับโรงเรือนทดลอง ณ โรงเรือนทดลองทุ่งตาแก้ว

ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb คละเพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 49 วัน จำนวน 200 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทสหฟาร์มโดยแบ่งไก่เป็น 4 กลุ่มการทดลอง (Treatment) กลุ่มละ 50 ตัว

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม ให้อาหารและน้ำปกติ

กลุ่มที่ 2 คือ ไก่ที่ให้อาหารปกติ และน้ำที่เสริมโพรไบโอติก 10^6 CFU/ml ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 3 คือ ไก่ที่ให้อาหารและน้ำปกติตลอดการทดลอง ที่อายุ 14 และ 21วัน ทำการป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis 10^8 cfu/ml

กลุ่มที่ 4 คือ ไก่ที่ให้อาหารปกติ และน้ำที่เสริมโพรไบโอติก 10^6 CFU/ml ตลอดการทดลอง ที่อายุ 14 และ 21 วัน ทำการป้อนเชื้อ *S.* Enteritidis 10^8 CFU/ml

ทุกสัปดาห์ทำการทดสอบ

3.5.2.3.1 ตรวจปริมาณสารพิษ (ฝ่ายควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์บริษัทสหฟาร์ม) และแบคทีเรียในอาหารไก่ ปริมาณสารพิษตรวจ 2 ตัวอย่างต่อเบอร์อาหาร ปริมาณแบคทีเรียตรวจ 1 ตัวอย่างต่อสัปดาห์

3.5.2.3.2 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำดื่ม และตรวจนับจำนวนเซลล์รอดชีวิตของ *Lactobacillus* sp. (10^6 CFU/ml) ที่ผสมในน้ำดื่มไก่ เก็บน้ำจากแหล่งน้ำปกติ 3 ตัวอย่าง และแหล่งน้ำไก่ที่ผสมโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส 3 ตัวอย่าง

3.5.2.3.3 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลไก่ 1 ตัวอย่างต่อกลุ่มการทดลอง

3.5.2.3.4 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างทางเดินอาหารไก่ที่อายุ 28, 35, 42, 49 วัน จากไก่ 4 ตัว ต่อกลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงอายุ

3.5.2.3.5 สุ่มเจาะเลือดไก่ศึกษาแอนติบอดีต่อ *Salmonellas* spp. แอนติบอดีต่อ Newcastle virus ปริมาณเม็ดเลือด ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น กลุ่มการทดลองละ 25 ตัว

3.5.2.3.6 ติดตามการเจริญเติบโตของไก่จากการประเมินผลของ FCR ADG เปอร์เซ็นต์การตายสะสม

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำน้ำหนักเฉลี่ยและค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ในแต่ละกลุ่มทดลองวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเปรียบเทียบผลการทดลองด้วย Duncan's multiple range test

3.7 สถานที่ทดลอง

1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เพื่อเตรียม *Lactobacillus* spp. และ *S.* Enteritidis และการทดสอบด้านจุลชีววิทยา

2. ฟาร์มเลี้ยงไก่ระดับพาณิชย์ ณ โรงเรือนสหฟาร์มพัฒนา ฟาร์ม 1 โรงเรือน 1, 2, 3, 11, 12,13

3. ฟาร์มทดลองระดับ Pilot scale ณ โรงเรือนทดลองสหฟาร์มพัฒนาโคกสลุง

4. โรงเรือนทดลองต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Enteritidis ณ โรงเรือนทดลองทุ่งตาแก้ว

3.8 พันธุ์ไก่และอาหารไก่

ในทุกการทดลองใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb 500 คละเพศ เริ่มทำการเลี้ยงตั้งแต่อายุ 1 วัน ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทสหฟาร์มตามช่วงอายุคือ

ตารางที่ 7 อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทสหฟาร์มตามช่วงอายุไก่

เบอร์อาหาร	ช่วงอายุ (วัน)
111	0-12
222	13-24
333	25-36
444	37-49

3.9 วิธีการทดลอง

3.9.1 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารไก่

1. ชั่งตัวอย่างอาหารไก่ 25 กรัม ผสมลงใน BPW 225 มล. บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 18 ชม.

2. นำมาทำการเจือจางด้วยระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

- ศึกษาจำนวนแบคทีเรียรวม บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *E.coli* และ Coliforms บนอาหารแข็ง coliform (CCA)จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *Lactobacillus* sp. บนอาหารแข็ง MRS จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน
- ตรวจหา *Salmonella* sp. ด้วยอาหารเหลว Rappaport-Vassiliadis (RV) อาหารแข็ง Brilliant Green (BG) และอาหารกึ่งเหลว-กึ่งแข็ง Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.9.2 ตรวจนับแบคทีเรียในน้ำดื่มไก่

1. เก็บตัวอย่างน้ำดื่มก่อนการผสมเชื้อโพรไบโอติก

2. นำ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบผสมในน้ำดื่มไก่ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย10^{6} CFU/ml และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหลังการผสม

3. นำตัวอย่างน้ำมาทำการเจือจางด้วยระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

- ศึกษาจำนวนแบคทีเรียรวม บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *E.coli* และ Coliforms บนอาหารแข็ง coliform (CCA)จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *Lactobacillus* sp. บนอาหารแข็ง MRS จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน
- ตรวจหา *Salmonella* sp. ด้วยอาหารเหลว Rappaport-Vassiliadis (RV) อาหารแข็ง Brilliant Green (BG) และอาหารกึ่งเหลว-กึ่งแข็ง Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.9.3 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างมูลไก่

1. ชั่งตัวอย่างมูลไก่ 25 กรัม ผสมใน BPW 225 มล. บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม.

2. นำมาทำการเจือจางด้วยระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์0.85%

- ศึกษาจำนวนแบคทีเรียรวม บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA)จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *E.coli* และ Coliforms บนอาหารแข็ง coliform (CCA)จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *Lactobacillus* sp. บนอาหารแข็ง MRS จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน
- ตรวจหา *Salmonella* sp. ด้วยอาหารเหลว Rappaport-Vassiliadis (RV) อาหารแข็ง Brilliant Green (BG) และอาหารกึ่งเหลว-กึ่งแข็ง Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.9.4 ตรวจนับแบคทีเรียจากตัวอย่างทางเดินอาหารไก่

1. นำ 1 ตัวอย่างทางเดินอาหารไก่ ตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน นำแต่ละส่วน แยกผสมลงใน BPW 100 มล.บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม.

2. นำมาทำการเจือจางด้วยระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์0.85%

- ศึกษาจำนวนแบคทีเรียรวม บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *E.coli* และ Coliforms บนอาหารแข็ง coliform (CCA) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม.
- ศึกษาจำนวน *Lactobacillus* sp. บนอาหารแข็ง MRS จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ในสภาวะไร้ออกซิเจน
- ตรวจหา *Salmonella* sp. ตามวิธีการตรวจ *Salmonella* sp. ด้วยอาหารเหลว Rappaport-Vassiliadis (RV) อาหารแข็ง Brilliant Green (BG) และอาหารกึ่งเหลว-กึ่งแข็ง Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.9.5 การตรวจ *Salmonella* sp. จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไก่แต่ละช่วงอายุ

1. นำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไก่ที่ผ่านการผสมใน BPW และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม.

2. ถ่ายตัวอย่างจากข้อ 5.1 หยดละ 0.1 มล. ลงบนอาหารกึ่งเหลว-กึ่งแข็ง MSRV 3 หยด/ ตัวอย่าง/ จานอาหารMSRV บ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 18 ชม.

3. พิจารณาจากสีของอาหาร MSRV จะเปลี่ยนจากสีเขียวแกมน้ำเงินใส เป็นสีขาวขุ่นรอบจุดที่หยดตัวอย่าง ซึ่งให้เป็นผลบวก ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างที่ให้ผลบวก 3 ลูป/1หยดของตัวอย่าง ผสมในอาหารเหลว RV 9 มล. บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม.

4. นำมาทำการเจือจางด้วยระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์0.85%

5. ศึกษาจำนวน *Salmonella* sp. บนอาหารแข็ง BG จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม.

6. อ่านผลของจำนวน *Salmonella* sp. โดยนับโคโลนีที่สีชมพูขาวทึบ และอาหารรอบๆ โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีแดง ร่วมกับการให้ผลบวกต่อการทดสอบ Oxidase test

7. ยืนยัน *Salmonella* sp. ที่แยกได้โดยเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกในข้อ 5.6 จากอาหาร BG 3-5 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSI (Triple sugar iron agar) และ Urease

8. พิสูจน์เอกลักษณ์ *Salmonella* spp. หลังการยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีตามกลุ่มซีโรวาร์ ด้วยวิธีทางซีโรวิทยา

หมายเหตุ : ดัดแปลงวิธีจากการตรวจซัลโมเนลลา ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.9.6 การทดสอบทางซีโรวิทยาเพื่อแยก *Salmonella* spp. ตามกลุ่มซีโรวาร์

หลังจากตัวอย่างผ่านการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นด้วย อาหารแข็ง Triple sugar iron agar (TSI) และ อาหาร Urease ได้เชื้อที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* แล้วนำมาทดสอบทางซีโรวิทยาด้วยวิธี Slide agglutination โดยทำการทดสอบเชื้อกับแอนติซีรัมจำเพาะมีขั้นตอนดังนี้

1. หยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ลงบน Slide 1 หยด เขี่ยเชื้อจาก TSI มาละลายใน 0.85% NSS กวนให้เข้ากัน แล้วสังเกตว่าเกิดการจับกลุ่มภายใน 30 วินาที หรือไม่ หากเกิดการตกตะกอนแสดงว่า เชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรไทป์ได้เนื่องจากเชื้อ rough (เชื้อ rough หมายถึง เชื้อที่มีลักษณะโคโลนีไม่เรียบ และจะตกตะกอนกับ 0.85% NSS และก็จะตกตะกอนกับ แอนติซีรัมทุกชนิด จะไม่สามารถที่จะวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อชนิดไหน) ถ้าไม่ตกตะกอนใน 0.85% NSS จึงทดสอบต่อไป

2. หยดแอนติซีรัม *Salmonella* Polyvalent A-67 และ *Salmonella* Polyvalent A-I บน slide อย่างละ 1 หยด และเขี่ยเชื้อจาก TSI มาทดสอบกับ antiserum ทั้ง 2 ชนิดกวนให้เข้ากันดีกับแอนติซีรัมทั้งสองชนิด เอียง Slide ไปมาหลาย ๆ ครั้ง สังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่เกิดขึ้นจะเห็นภายในเวลา 30-60 นาที ถ้าตกตะกอนต่อแอนติซีรัมใดแสดงว่าเชื้อมีแอนติเจนต่อแอนติซีรัมนั้น แต่เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้แอนติซีรัมรวมหลายชนิดจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น group ใดอาจเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Salmonella* group A ถึง *Salmonella* group I กรณีที่ให้ผลบวก (+) *Salmonella* Polyvalent A-I ในกรณีให้ผลลบ (-) *Salmonalla* Polyvalent A-I และให้ผลบวกต่อ *Salmonella* Polyvalent A-67 แสดงว่าเชื้อนี้จะอยู่ในระหว่างช่วง *Salmonella* group J ถึง *Salmonella* O:67

3. หลังจากนั้นให้ทดสอบกับแอนติซีรัม แต่ละ group ที่ต้องการทดสอบคือ *Salmonella* group B, group C, group D, group E ถ้าให้ผล group ใดบวกให้รายงานว่าเป็น *Salmonella* group นั้นเช่น ให้ผลบวกกับแอนติซีรัม *Salmonella* group B แสดงว่าเชื้อที่นำมาจาก TSI นั้น เป็น *Salmonella* group B

3.9.7 การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC count) (เฉลียว ศาลากิจ, 2541)

หลักการ ในน้ำยาละลายเม็ดเลือดขาว จะมีตัวทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และมีสีที่ย้อมนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาว

1. ผสมเลือดให้เข้ากันดี

2. ดูดเลือดเข้า WBC diluting piptte ขึ้นถึงขีด 0.5

3. แล้วนำมาดูดน้ำยาละลายเม็ดเลือดขาวให้ถึงขีด 11 เขย่าสารละลายผสมให้เข้ากัน

4. หยดสารละลายผสมลงบน counting chamber และปิดด้วย coverglass วางทิ้งไว้สักครู่

5. นับเม็ดเลือดขาวโดยใช้เลนส์วัตถุ 10x

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.8 การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (Differential count) (เฉลียว ศาลากิจ, 2541)

เป็นการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวออกมาเป็นร้อยละ โดยใช้สเมียร์เลือดที่ย้อมสีแล้ว

การทำสเมียร์เลือด Slide method

1. ผสมเลือดให้เข้ากันดี หยดเลือดลงบนสไลด์แก้วให้ห่างจากปลายทางขวาประมาณ 0.5-0.8 ซม.

2. วางตัวไถสไลด์ลงบนสไลด์แก้ว รอให้เลือดกระจายตามขอบตัวไถสไลด์ให้ห่างจากขอบแต่ละข้างประมาณ 0.2 ซม. และดันไปข้างหน้าด้วยความเร็วคงที่ เพื่อให้สเมียร์เลือดไม่ติดขอบสไลด์แก้ว

3. ปล่อยสเมียร์เลือดให้แห้งในอากาศ

วิธีการย้อมสเมียร์เลือดด้วย Modified Wright stain

1. ทำสเมียร์เลือด รีบโบกให้แห้ง

2. ตรึงสเมียร์เลือดใน absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที ใน coplin jar ซึ่งมีร่องใส่สไลด์ 5 ร่อง แต่ใส่สเมียร์เลือดได้ทีละ 10 แผ่น โดยประกบด้านหลังสเมียร์เลือดชนกัน ควรใช้ปากคีบเอาออกจาก coplin jar เบอร์ 1 เมื่อครบ 5 นาที นำสเมียร์เลือดออกมาตากให้แห้ง

3. จุ่มลงในสี Modified Wright stain เป็นเวลา 10 นาที

4. ใช้ปากคีบหยิบสเมียร์เลือดจาก coplin jar เบอร์ 2 มาใส่ใน coplin-jar เบอร์ 3 ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 10 นาที

5. เปิดน้ำประปาให้ไหลพอประมาณ ก่อนใช้ปากคีบเบอร์ 3 หยิบสเมียร์ขึ้นมาทีละแผ่นโดยให้น้ำไหลจากหางสเมียร์เลือดไปทางหัวสเมียร์ ใช้มือหรือฟองน้ำถูตะกอนสีที่ติดอยู่ด้านตรงข้าม สเมียร์เลือดออกให้สะอาด

3.9.9 วิธีหาค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume, PCV) หรือ ฮีมาโตคริต (Hematocrit)

1. ผสมเลือดให้เข้ากัน

2. เอา capillary tube ใส่ในขวดเลือด เอียงขวดให้เลือดไหลเข้ามาใน capillary tube เกือบเต็มหลอด

3. ใช้ปลายนิ้วอุดปลายบนของหลอดไว้ แล้วเช็ดเลือดที่เลอะข้างหลอด แล้วนำไปอุดด้วย wax

4. นำไปปั่นในเครื่อง microcentrifuge โดยวาง capillary tube ให้ปลายอุดอยู่ด้านนอก ปั่นนาน 5 นาที

5. นำออกมาอ่านโดยใช้ PCV reading chart โดยวาง capillary tube ให้อยู่ในแนวตั้งฉาก ปลายบนอยู่ที่ขีด 100 ปลายล่างอยู่ที่ขีด 0 อ่านค่าฮีมาโตคริตออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ: ผลที่ได้แสดงรูปร่างเม็ดเลือดชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูป และในส่วนการแสดงผลการทดลองนี้ได้รับความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.10 วิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อซัลโมเนลลาในซีรัมไก่

โดยอาศัยหลักการเกิด Agglutination ดัดแปลงจากคู่มือบริษัท S&A REAGENTS LAB Ltd.,Part. (ในงานวิจัยทดสอบแอนติบอดีในซีรัมเลือดไก่ต่อแอนติเจนซัลโมเนลลากลุ่ม B, C1, C2, D, E1, E4, H)

1. เจือจางซีรัมในจานหลุม

1.1 ดูดซีรัมในเลือดไก่ 200 µl ใส่หลุมที่ 1

1.2 ดูด 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ใส่หลุมที่ 2, 3, 4, 5 หลุมละ 100 µl

1.3 ดูดซีรัมจากหลุมที่ 1 ใส่หลุมที่ 2 ที่มี 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์100 µl ผสมให้ เข้ากัน และดูดสารผสมที่ได้จากหลุมที่ 2 ปริมาณ 100 µl ใส่หลุมที่ 3 ที่มี 0.85% สารละลายโซเดียมคลอไรด์100 µl ทำเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 5

1.4 ดูดส่วนผสมหลอดที่ 5 ทิ้ง 100 µl

2. ใส่แอนติเจนซัลโมเนลลาจำนวน 100 µl ในทุกหลุม ความเจือจางจะเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ตามลำดับ

3. เขย่าจานหลุมเพื่อให้แอนติเจนกับซีรัมผสมกันทิ้งไว้ซักครู่

4. ผลบวกคือจะเห็นการจับกันระหว่างแอนติเจนซัลโมเนลลากับซีรัมเกิดเป็นตะกอน

5. อ่านผล titer จากการเกิดผลบวกที่ลำดับการเจือจางซีรัมสูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย