



ISOLATION OF SALMONELLA SPECIES FROM SLAUGHTER HOUSE.

สมชาย นิยมไทย วท.บ. (เทคนิคการแพทย์).

เนตร สุวรรณคุณาสัน วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), Cert. Imm., Cert. Med. Micro.*

ก่อนหน้าที่จะทำการวิเคราะห์เชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ครั้งนั้น ได้มีผู้เคยแยกเชื้อ Salmonella จากที่ต่าง ๆ มาแล้ว เช่น จากแม่น้ำ เนื้อและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อ เป็นต้น ซึ่งวิธีและอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อก็มีต่าง ๆ กันในปี 1966 Spino, D.F. (1) ใช้ Moore's swab เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำมาแยกหา Salmonella โดยใช้ Selenite brilliant green sulfa, Tetrathionate และ Brilliant green agar plate อนุที่ 41.5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการใช้ตัวอย่างเดียวกันจำนวนเท่ากัน แต่อนุที่ 37 ชั่วโมง พบว่าที่ 41.5 ชั่วโมงพบ Salmonella แต่ที่ 37 ชั่วโมงไม่พบเชื้อเลยในปีเดียวกันนั้น Harvey, Price และ Dixon (2) ทำการแยกเชื้อ Salmonella subgroup III โดยใช้ Selenite F broth เป็น Enrichment media อนุที่ 37 ชั่วโมง และ 43 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใช้ได้จากโรงฆ่าสัตว์ในอังกฤษและเวลส์ สามารถแยกเชื้อได้ 6 strain. ต่อมาในปี 1967 Harvey และ Price (3) ได้ทำการวิเคราะห์หา Salmonella

จากอาหารสัตว์ โดยใช้ motility technique ร่วมกับ selective toxic chemical อนุที่ 37 ชั่วโมง และ 43 ชั่วโมง พบ Salmonella 16 serotype จาก primary enrichment และ 27 serotype จาก secondary enrichment

ในปี 1969 Weissman และ Carpenter (4) ใช้ Tetrathionate broth ที่มี brilliant green dye ในการหา Salmonella จากทวารหนักที่ตายแล้ว โดยเลือกเอาบริเวณ cervical และ anal เป็นตัวอย่างในการหา พบ Salmonella 56% ในหมู และ 74% ในวัว และยังพบอีกว่า 38% ของไส้กรอกที่ทำจากเนื้อหมู และ 9% ของไส้กรอกรมควัน มี Salmonella ปะปนอยู่ด้วย ปี 1973 Harvey, Price และ Hall (5) ได้ร่วมกันหา Salmonella จากโรงฆ่าสัตว์โดยใช้ Selenite F broth อนุที่ 43 ชั่วโมง และเลี้ยงเพื่อคัดกรองที่ในวันอ่อนที่มีและไม่มี Agglutinating antisera ปะปนอยู่ และใช้ Brilliant green และ Mac

*ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Conkey, Deoxycholate citrate agar เป็น secondary enrichment และ plating media ตามลำดับ ปี 1973 Carpenter, Elliof และ Reynold (6) นำตัวอย่างซึ่งเป็นเนื้อหมูจากโรงฆ่าสัตว์ 4 แห่ง ใช้ Tetra-thionate brilliant green broth อบที่ 37°ซ เชื้อที่แยกได้ส่วนมากเป็น *S. derby*, *S. anatum*, *S. typhimurium*, *S. indiana* ในปี 1974 Phirke (7) ได้วิเคราะห์หา *Salmonella* จากน้ำเสีย เก็บตัวอย่างโดยใช้ swab ใช้ Selenite brilliant green broth อบที่ 41.5°ซ เปรียบเทียบกับตัวอย่างอีกชุด อบที่ 37°ซ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 41.5°ซ สามารถพบ *salmonella* ได้มากกว่าที่ 37°ซ

ผู้เขียนได้วิเคราะห์น้ำล้างเนื้อจากโรงฆ่าสัตว์ในเชียงใหม่เพื่อหา *Salmonella* การทดลองทำ 2 ชุดๆ หนึ่งใช้ Selenite F broth อบที่ 43°ซ ชุดที่ 2 ใช้ Gram Negative broth อบที่ 37°ซ Plating media ใช้ SS agar และ Mac Conkey agar อบที่ 37°ซ การทดลองนี้เป็นการศึกษาวิเคราะห์เพื่อแยกหา *Salmonella* และการใช้ Selective media ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในการอบเชื้อที่ 43°ซ ซึ่งประเมินการจะทำให้พบ *Salmonella* ได้มากกว่าที่ 37°ซ ใน Gram negative broth วัดดูและวิธีการ

ใช้ Moore's Swab (1) เก็บตัวอย่างทำจากสำลีซึ่งถูกซับของเหลวบนให้เป็นก้อนกลม ห่อด้วยผ้า Gauze ให้มีเส้นผ่า

ศูนย์กลางประมาณ 7-8 เซนติเมตร ก่อนใช้นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°ซ 20 นาที นำ swab ไปวางที่โรงฆ่าสัตว์โดยวางในร่องน้ำซึ่งเป็นทางระบายน้ำจากการล้างเนื้อ เลือด อูจจาระ บั๊ตตะวะของสัตว์ที่ถูกฆ่า สำลีใน swab ก็จะถูกซึมน้ำเหล่านั้นไว้ โดยที่เรานำไปวางในร่องน้ำนั้นก่อนกลางคืน และนำมาวิเคราะห์ที่ต้องปฏิบัติการในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น

Swab ที่ใช้ทั้งหมด 12 swab ต่อ 1 ครั้ง โดยวางในโรงฆ่าหมู 4 จุดที่ร่องน้ำ ด้านซ้าย 2 จุด (นอกและใน) ด้านขวา 2 จุด ในโรงฆ่าวัว 2 จุดแต่ละจุดใช้ 2 swab. swab ที่ซึมน้ำไว้ตลอดทั้งคืนถูกนำกลับห้องปฏิบัติการ โดยใส่ในขวดปากกว้างขนาดความจุ 4 ออนซ์ 1 swab ต่อ 1 ขวด เพราะฉะนั้นจากแต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างจะได้ตัวอย่างใส่ขวด 2 ขวด ขวดหนึ่ง เติม selenite F broth ลงไปจนท่วม อบที่ 43°ซ อีกขวดเติม Gram negative broth อบที่ 37°ซ 1 คืน เมื่อครบกำหนดนำ broth 1 loop มา streak ลงบน SS agar และ Mac Conkey agar โดยทวอย่างจาก 1 ขวด จะเลื่องบนอาหารทั้งสองชนิดๆ ละ plate อบที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง จากนั้น pick เอา colony ที่ไม่มีสี (non lactose ferment) จาก Mac Conkey ลง TSI 1 colony ต่อ 1 TSI จาก SS agar pick เอา colony ที่ไม่มีสีทั้งที่มีจุดสีดำของ hydrogen sulfide และไม่มี ลง TSI เช่นกัน อบที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง

เลือก TSI ที่ให้ reaction เป็น alkaline slant, acid butt และ alkaline slant, acid butt ที่มี hydrogen sulfide ซึ่งน่าจะถือว่าเป็น Salmonella นำไป identify โดยใช้ Biochemical test media ต่อไปนี้ Motility media, Citrate slant, Urea slant, Phenylalanine slant, จาก 1 TSI ลง Biochemical media 1 ชุด อบที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง จากนั้นก็ดู Reaction ที่เกิด Reaction ที่น่าจะเป็น Salmonella หลังจากดู Biochemical test TSI ที่สงสัย

ว่าจะเป็น Salmonella นำไป Type กับ Salmonella O antisera (DIFCO) เป็น การยืนยันอีกครั้ง

ผลการวิเคราะห์

จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ 36 ครั้ง เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 391 ตัวอย่างในจำนวน นี้ได้จากโรงฆ่าหมู 267 ตัวอย่าง จากโรงฆ่าวัว 134 ตัวอย่าง พบ Salmonella ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง สรุปผลการวางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อและเปอร์เซ็นต์ที่พบเชื้อ

สถานที่	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	% ที่พบ
โรงฆ่าหมู	267	35	13.61
โรงฆ่าวัว ควาย	134	20	14.92
รวม	391	55	14.07

Salmonella ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ เมื่อนำไป identify โดยใช้ Salmonella O antiserum Group ต่าง ๆ บรากลกว่า Salmonella Group E พบ ได้มากที่สุดทั้ง จากโรงฆ่าหมูและโรงฆ่าวัว ควาย รายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและเปอร์เซ็นต์ของ Salmonella group ต่าง ๆ ที่พบ

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	SALMONELLA							
		Group B		Group C ₁		Group C ₂		Group E	
		จำนวน %		จำนวน %		จำนวน %		จำนวน %	
โรงฆ่าหมู	35	13	37.14	4	11.43	4	11.43	14	40.00
โรงฆ่าวัว ควาย	20	5	25.00	3	15.00	0	0	12	60.00
รวม	55	18	32.73	7	12.73	4	7.23	26	47.27

การใช้ media ต่างชนิดกันเป็น primary enrichment media ในการแยกเชื้อ Salmonella รวมทั้งการใช้อุณหภูมิมืดเชื้อที่ต่างกัน ทำให้อัตราการพบ Salmonella จากตัวอย่างต่างกันด้วย พบว่าการใช้ Selective media (Selenite F broth) อบที่ 43°ซ สามารถพบเชื้อได้มากกว่าใช้ General media (Garm negative broth) อบที่ 37°ซ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบอัตราการพบ Salmonella ใน primary media 2 ชนิด

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	PRIMARY MEDIA			
		SELENITE F (43° C)		GRAM NEGATIVE (37° C)	
		จำนวน	%	จำนวน	%
โรงฆ่าหมู	35	27	77.14	8	22.86
โรงฆ่าวัว ควาย	20	15	75.00	5	25.00
รวม	55	42	76.36	13	23.64

วิจารณ์ผลการวิเคราะห์

การแยกและวิเคราะห์เชื้อ Salmonella จากโรงฆ่าสัตว์เทศบาลนครเชียงใหม่ ซึ่งสัตว์ที่ฆ่ามีดังนี้ หมูวันละประมาณ 195 ตัว วัววันละ 25 ตัว และควาย 4 ตัว จากการเก็บตัวอย่าง 36 วัน ปรากฏว่า Salmonella จากโรงฆ่าวัว ควายพบได้ในจำนวนที่สูงกว่าโรงฆ่าหมู (ตารางที่ 1) โดยคิดเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่ทั้งสอง Salmonella ที่พบรวมทั้งหมด 14.07% ซึ่งเป็นจำนวนที่มากพอสมควร Salmonella ที่แยกได้จากโรงฆ่าสัตว์ทั้งสองนี้อาจมาได้จากแหล่ง 2 แหล่ง คือ

1. ประปนมากับสัตว์โดยติดอยู่ภายนอกร่างกาย ตามตัวและขา
2. ประปนอยู่ภายในตัวสัตว์ อยู่ในเลือด อุจจาระ บั๊ตสวาระของสัตว์ทั้งนี้เพราะตัวอย่างที่

เก็บมาเป็นน้ำที่ใต้จากการล้างทั้งภายนอกตัว สัตว์ ล้างเนื้อที่ฆ่าแหละแล้วและล้างอุจจาระ บั๊ตสวาระของสัตว์ ซึ่งขณะที่เชื้ออยู่ในตัวสัตว์ สัตว์อาจกำลังเป็นโรคหรืออยู่ในสภาพเป็นพาหะเชื้อ Salmonella ที่แยกมาได้พบเพียง 4 Group คือ B, C₁, C₂ และ E (ตารางที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่า Salmonella Group E พบได้มากที่สุด ซึ่งโดยปกติ Salmonella Group นี้พบมากในสัตว์ จากการศึกษานับปัจจุบันพบว่าเชื้อ Group นี้ทำให้เกิดโรคในคนได้โดยปกติจะพบได้บ่อยๆ ในคนที่รับประทาน แหนม, ปลา, ก้อย, ที่สุกๆ ดิบๆ แล้วต่อมากจะมีอาการของ Food poisoning ส่วน Group อื่นๆ เช่น Group C₁ มีเชื้อที่พบบ่อยในหมูคือ S. choleraesuis ก็ทำให้เกิด Gastroenteritis ได้ แหล่งที่มาของเชื้อก็ คือ ประปนมา กับเนื้อสัตว์

และถ้าไม่ได้ทำให้สุกก่อนรับประทาน เชื้อไม่ถูกทำลายก็จะทำให้เกิดอาการของอาหารเป็นพิษได้

การวิเคราะห์แยกเชื้อครั้งนี้ แบ่งเป็น group ต่าง ๆ โดยใช้ serotyping แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นเชื้อ species ใด ถ้ามี antiserum ของ subgroup หรือของแต่ละ species ก็จะสามารถบอกได้ว่า Salmonella ที่พบนี้อาจเป็นตัวใดได้บ้าง

ที่แยกได้จะมี reaction ใน TSI ต่าง ๆ กัน เช่น การสร้าง hydrogen (สีคำ) มากน้อยต่างกัน หรือบางตัวอาจไม่ให้ แต่การวิเคราะห์ครั้งนี้จะถือ group ที่แยกได้โดย Serotyping เป็นสำคัญ คือ ถ้า TSI ใดก็ตามให้ reaction ต่างกันดังกล่าวแต่ได้จากการเก็บตัวอย่างในวันเดียวกัน จากจุดที่เก็บเดียวกัน แล้วจาก identify อยู่ใน group เดียวกัน จะนับรวมเป็นตัวอย่างที่พบเพียง 1 ตัวอย่าง

Salmonella ที่พบและแยกได้ในวันเดียวกัน เก็บตัวอย่างจากบริเวณต่างกันอาจพบเชื้อ group เดียวกัน หรือต่าง group กันก็ได้ เพราะตัวอย่างน้ำที่เก็บมาเป็น "Pool sample" ซึ่งได้มาจากสัตว์หลายตัว เช่น การเก็บตัวอย่างที่จุด ก. และ ข. สัตว์ที่ฆ่าที่จุดทั้งสองเป็นคนละตัวกันและจำนวนต่างกันด้วย ที่จุด ก. อาจพบเชื้อ group เดียวกัน หรือต่าง group กันก็ได้ เราไม่ทราบได้แน่ชัดเพราะไม่ได้เก็บตัวอย่างจากสัตว์แต่ละตัว

การใช้ Selenite F broth ซึ่งเป็น Selective media สำหรับ Salmonella และการใช้อุดหนุนในการอบเชื้อที่ 43°ซ จะพบเชื้อได้มากกว่าการใช้ Gram Negative broth อบที่ 37°ซ (ตารางที่ 3) ซึ่งผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับการทดลองของ Spino, (1) และ Pirke, (7) แม้ว่า media ที่ใช้จะต่างกันบ้าง และอุณหภูมิที่ใช้จะต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่ก็ยังคงเป็นการใช้อุดหนุนที่สูงกว่า 37°ซ เนทและ กัมพล (8) ได้เคยทำการทดสอบการเจริญของ enteric pathogens ซึ่งมี Salmonella รวมอยู่ด้วย โดยการให้ Selenite F และ Gram Negative broth ทั้ง 2 ชนิดอบที่ 37°ซ พบว่าอัตราการพบเชื้อจาก media ทั้งสองเท่าๆ กันจะ เห็นได้ว่า Selenite F ถึงแม้จะเป็น Enrichment media ที่ส่งเสริมการเจริญของ Salmonella ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นแต่เมื่อนำมาอบที่ 37°ซ เชื้ออื่นๆ ก็ยังสามารถเจริญได้ก็ทำให้อัตราการพบและแยก Salmonella ลดลง แต่จากการทดสอบครั้งนี้พบว่าการใช้ enrichment media ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิ ในการ อบเชื้อ จะช่วยให้พบ Salmonella ได้เพิ่มขึ้น Gram Negative broth เป็น media ที่เชื้ออะไรก็ตามที่เป็นพวก gram negative ก็สามารถเจริญได้ ดังนั้นอัตราการพบ Salmonella จึงน้อยลงเพราะเชื้ออื่นเจริญกลบ Salmonella หมด และการใช้อุณหภูมิ 37°ซ Salmonella มีอัตราการเจริญ

ที่ช้ากว่าพวก Coliform เพราะฉะนั้น Coliform จะเจริญกลับ Salmonella หมดหรือเกือบหมด โอกาสพบ Salmonella ก็น้อยลง แต่ที่อุณหภูมิถึง 43°C การเจริญของ Coliform ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับ Salmonella ซึ่งยังเจริญได้ดีกว่า ฉะนั้นโอกาสพบ Salmonella จึงมีมากขึ้น (Spino)

โดยที่ Salmonella สามารถแพร่กระจายได้ด้วยการปะปนไปกับน้ำ จากการพบ Salmonella ในโรงฆ่าสัตว์ น้ำเสียที่ระบายออกมาจะมี Salmonella ปนอยู่ ถ้าไม่มีระบบกำจัดเชื้อโรคในโรงฆ่าสัตว์ เมื่อน้ำไหลลงสู่แม่น้ำ, ลำคลอง เชื้อก็จะกระจายไปยังที่ต่างๆ อาจทำให้เกิดการระบาดของโรคทั้ง ในคน และสัตว์ได้ ดังที่ Harvey และ Price (3) ได้เคยทำและพบมาแล้ว

คำขอขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณ สัตวแพทย์วิสิทธิ์ พรหมทัต สัตวแพทย์ผู้ควบคุมโรงงานฆ่าสัตว์ เทศบาลนครเชียงใหม่ ที่กรุณาให้ความร่วมมือในการวิเคราะห์เชื้อชาติโมเนลลาครั้งนี้

Abstract

The isolation of salmonella species from Chiang Mai slaughter house by using cotton swab for sampling from the drainage. The swabs were put into

Selenite F broth and Gram Negative broth, and then incubated at 43°C and 37°C respectively. After the cultures were incubated overnight, inoculated onto SS and Mac Conkey agars. Selected suspect colony into T.S.I. agar and identified by biochemical reaction test and confirmed by anti O Salmonella typing.

Salmonella were isolated 13.61% from pigs and 14.92% from cows. The total of the recoveries were 14.07%. It was found 76.36% of salmonella from Selenite F broth and 23.64% from Gram Negative broth. The salmonella species were group E. 41.27%, B 32.73%, C₁ 12.73% and group C₂ 7.27%.

เอกสารอ้างอิง

1. Spino, D.F.; Elevated Temperature Technique for the Isolation of Salmonella from Stream, Appl. Microbiol. 14: 591-596, 1966.
2. Harvey, R.W.S., Price, T.H. and Dixon, J.M.S.; Salmonella of Subgenus III (Arizona) Isolated from Abattoirs in England and Wales, J. Hyg. (Camb), 64:271-273, 1966.
3. Harvey, R.W.S. and Price, T.H.; The Isolation of Salmonella from Animal Feeding Stuff. J. Hyg. (Camb.), 65:237-243, 1967.

4. Weissman, M.A. and Carpenter, J.A.; Incidences of Salmonella in meat and meat products. Appl. Microbiol. 17:899-902, 1969
 5. Havey, R.W.S., Price, T.H. and Hall, M.L.M.; Isolation of Subgenus III Salmonella (Arizona) in Cardiff. J.Hyg. 71:481-485, 1973.
 6. Carpenter, J.A Elliot, J., Gand, Reynold, A.E.; Isolation of Salmonella from Pork Carcasses. Appl. Microbiol. 25: 731-734, 1973
 7. Pirke, P.M.; Elevated Temperature Technique for Enumeration of Salmonella in Sewage. Indian J.Med. Res., 62:938-944, 1974.
 8. Suwankrughasn, N. and Panas-Am-pol, K.; Isolation of enteric Pathogens "Comparison of different enrichment and plating media for recovery of medically important bacteria from human stools specimens". Bul. of Chiang Mai Med. Tech. 5:23-29, 1972.
-