

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

การศึกษาเรื่อง การตรวจหาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารปรุงสำเร็จที่จำหน่าย ณ โรงอาหารในโรงพยาบาลของรัฐแห่งหนึ่ง ครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงวิเคราะห์ เพื่อตรวจหาแบคทีเรียในอาหารปรุงสำเร็จแบ่งตามวิธีปรุง 4 ประเภท ที่จำหน่าย ณ โรงอาหารในโรงพยาบาลของรัฐแห่งหนึ่ง คือ อาหารประเภทต้ม อาหารประเภทผัด อาหารประเภทแกง และอาหารประเภทยำ จำนวน 6 ร้านในระหว่างวันที่ 25 มกราคม ถึงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2551 ใช้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

ประชากร

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือ อาหารปรุงสำเร็จที่แบ่งตามวิธีปรุง 4 ประเภท ซึ่งจำหน่ายในโรงอาหารโรงพยาบาลของรัฐแห่งหนึ่ง จำนวน 6 ร้าน โดยแบ่งประเภทอาหารออกเป็นอาหารประเภทผัด อาหารประเภทต้ม อาหารประเภทแกง และอาหารประเภทยำ ซึ่งกลุ่มตัวอย่างอาหารประกอบด้วย

อาหารประเภทผัด ได้แก่ ผัดหน่อไม้ ผัดเต้าหู้ทรงเครื่อง ผัดกระเพราหมู (4 ตัวอย่าง) ผัดฟักทองใส่ไข่ ผัดเห็ดใส่หมู ผัดผักกาดใส่หมู (3 ตัวอย่าง) ผัดต้นหอม ผัดถั่วงอกใส่ลูกชิ้น ผัดถั่วงอก ผัดเผ็ดปลา ผัดวุ้นเส้นใส่กุ้ง ผัดผักกาดดองใส่วุ้นเส้น และ ผัดแตงกวาใส่กุ้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 18 ตัวอย่าง

อาหารประเภทต้ม ได้แก่ ต้มจืดหัวผักกาด (2 ตัวอย่าง) ต้มผักกาดดอง (2 ตัวอย่าง) ต้มจืดมะระยัดไส้ ต้มจืดเต้าหู้ไข่ ต้มจืดวุ้นเส้น (2 ตัวอย่าง) ต้มจืดเต้าหู้หมูสับ ต้มไข่พะโล้ (2 ตัวอย่าง) ต้มจืดวุ้นเส้นใส่เต้าหู้ไข่ และ ต้มจืดสาหร่ายใส่เต้าหู้ไข่ รวมทั้งสิ้นจำนวน 13 ตัวอย่าง

อาหารประเภทแกง ได้แก่ แกงส้มผักรวม แกงไตปลา (2 ตัวอย่าง) แกงเขียวหวานลูกชิ้น แกงจืดเห็ด (2 ตัวอย่าง) แกงผักกาด (2 ตัวอย่าง) แกงหน่อไม้ดอง (2 ตัวอย่าง) แกงเขียวหวานไก่ (4 ตัวอย่าง) แกงเผ็ดปลาตุ๋น (2 ตัวอย่าง) แกงแคหมูสับ แกงแคไก่ พะแนงหมู และ แกงเขียวหวานยอดมะพร้าวอ่อน รวมทั้งสิ้นจำนวน 20 ตัวอย่าง

อาหารประเภทยำ ในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างอาหาร ไม่มีอาหารประเภทยำ รวมตัวอย่างอาหารทั้งสิ้น 51 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ Escherichia coli (E.coli) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการวิธี MPN และใช้แบบสังเกตอย่างมีโครงสร้างในการสังเกตพฤติกรรมของผู้สัมผัสอาหารแบบไม่มีส่วนร่วม มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ Escherichia coli (E.coli) ในอาหารปรุงสำเร็จ ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ วิธี MPN (Most Probable Number ระบบ 3, 3, 3)

เครื่องมือประกอบด้วย

1. ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator)
2. เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (Autoclave)
3. เตาอบร้อน (Hot-air Sterilizing Oven)
4. อ่างน้ำร้อน (Coliform bath)
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Analytical balance)
6. เครื่อง Stomacher
7. กัด้องจุลทรรศน์
8. ตู้ปราศจากเชื้อลามินาโพลว์

อุปกรณ์ประกอบด้วย

1. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. หลอดดูดปราศจากเชื้อขนาด 2.0 และ 10.0 มิลลิลิตร
3. จานแก้วเพาะเชื้อปราศจากเชื้อขนาด 100x15 มิลลิเมตร
4. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 150x15 มิลลิลิตร
5. หัวงและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop)

2. แบบสังเกตแบบมีโครงสร้าง ใช้เพื่อสังเกตการปฏิบัติตัวของผู้สัมผัสอาหารตามหลักสุขาภิบาลอาหารแบบไม่มีส่วนร่วม ซึ่งสามารถสังเกตผู้สัมผัสอาหารทุกคนได้

การตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือ

การศึกษานี้ ใช้อุปกรณ์ที่มีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารปรุงสุกทั่วไปของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

,2544) และมีผู้วิเคราะห์ เป็นผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจตัวอย่างอาหารทางด้านงานจุลชีววิทยาทางอาหาร ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ ดังนี้

1. อุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการ

1.1 ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการให้อุณหภูมิที่เหมาะสมและคงที่แก่แบคทีเรีย ซึ่งต้องการเพาะเลี้ยง ปกติจะใช้อุณหภูมิที่ 35-37°C

การควบคุมคุณภาพ โดยตรวจสอบความแม่นยำของเทอร์โมมิเตอร์ทุก 3 เดือน อุณหภูมิที่วัดได้จากเทอร์โมมิเตอร์ประจำเครื่องกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานควรแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 2^{\circ}\text{C}$ และมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

การกระจายความร้อน โดยการวัดอุณหภูมิที่วัดได้ตามตำแหน่งต่างๆภายในตู้ไม่ควรแตกต่างกัน $\pm 2^{\circ}\text{C}$

สถานะไร้ออกซิเจน ทดสอบโดยใช้แถบเคมี methylene blue ทำทุกครั้งที่ใช้งาน โดย methylene blue เป็นดัชนีเพื่อแสดงว่ามีออกซิเจนหรือไม่ เนื่องจาก methylene blue จะมีสีฟ้าเมื่อมีออกซิเจน แต่จะไม่มีสีเมื่อไม่มีออกซิเจน

1.2 เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (Autoclave) เป็นเครื่องมือที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ไอน้ำ โดยทั่วไปใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การควบคุมคุณภาพ ตรวจสอบการกระจายความร้อนภายในเครื่อง โดยใช้แถบเคมี ซึ่งจะไวต่อไอน้ำ เมื่อสัมผัสกับไอน้ำจะเปลี่ยนสีทันที โดยไม่ต้องได้รับไอน้ำ ณ เวลาและอุณหภูมิที่กำหนด ซึ่งจะทำทุกครั้งที่ใช้งาน และมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่น ที่ 95%

การประเมิน แถบเคมีเปลี่ยนสีตามที่บริษัทกำหนด และความเข้มของสีสม่ำเสมอ

ตรวจสอบการไร้เชื้อ โดยการใช้เชื้อ Bacillus sterothermophilus ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55-60°C เมื่อเจริญจะสร้างกรด ซึ่งจะเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ภายในหลอดทดสอบคือ Bromocresal purple จากสีม่วงเป็นสีเหลืองโดยเชื้อนี้สามารถทนอุณหภูมิสูง (121°C) ได้นาน 5 นาที แต่จะถูกฆ่าตาย ถ้าสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมินี้ นาน 15 นาที

การประเมิน หลอดทดสอบไม่มีการเปลี่ยนสี หลังจากบ่มเพาะเชื้อ ตามที่บริษัทกำหนด

1.3 เตาอบร้อน (Hot-air Sterilizing Oven) เป็นเครื่องมือที่ให้ความร้อนเพื่อให้โมเลกุลของน้ำระเหยออกจากวัตถุที่ต้องการอบ โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับวัตถุที่จะนำมาอบ

การควบคุมคุณภาพ ตรวจสอบความแม่นยำของเทอร์โมมิเตอร์ ตรวจสอบทุก 3 เดือน และมีการรับรองคุณภาพโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95 %

การประเมิน อุณหภูมิที่วัดได้จากเทอร์โมมิเตอร์ประจำเครื่องกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานควรแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 2^{\circ}\text{C}$

1.4 อ่างน้ำร้อน(Thermal bath) ควบคุมอุณหภูมิที่ 45.5°C อุณหภูมิที่วัดได้จากเทอร์โมมิเตอร์ประจำเครื่องควรแตกต่างกันไม่เกิน $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ได้รับการรับรองโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

1.5 เครื่องชั่ง(Analytical balance) ได้รับการรับรองโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี มีค่าความคลาดเคลื่อนที่ 0.001

1.6 เครื่อง Stomacher เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการบดอาหารให้เข้ากัน ได้รับการรับรองโดยสถาบันอาหารทุก 1 ปี

1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบความปราศจากเชื้อ โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณร้อยละ 5 ของจำนวนที่เตรียมทั้งหมด อบที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าพบว่ามีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะต้องไม่นำอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมาใช้ pH ของอาหาร ค่าที่วัดได้จะต้องไม่เกิน ± 0.2 ของค่า pH ที่ระบุไว้สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น

2. วิธีการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการคือ วิธี MPN (Most Probable Number) ระบบ 3,3,3 มีหลักการคือ จุลินทรีย์จะมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในของเหลว ถ้าแบ่งของเหลวนี้ออกเป็น ส่วนๆเท่าๆกัน แต่ละส่วนจะมีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน อาจมากกว่าหรือน้อยกว่าบ้าง โดยใช้ระบบ 3 หลอด หมายถึง จำนวนของหลอดเลี้ยงเชื้อที่ใช้หมักต่อปริมาณตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมี 3 หลอด มีปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่างอาหารที่ใช้ต่างกันดังนี้คือ อัตราส่วน 1 ต่อ 10 อัตราส่วน 1 ต่อ 100 และ อัตราส่วน 1 ต่อ 1000 ค่าเฉลี่ยที่ได้นี้คือ MPN ซึ่งเป็นค่าทางสถิติไม่มีหน่วย ซึ่งวิธีการนี้ เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารปรุงสุกทั่วไปของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ไพรินทร์ บุตรกระจ่าง,2544) มีค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

3. การหาความเที่ยงตรงด้านเนื้อหาของแบบสังเกต ผู้ศึกษาได้นำแบบสังเกตแบบมีโครงสร้างให้ผู้ทรงคุณวุฒิ จำนวน 3 ท่าน ตรวจสอบความครอบคลุมของเนื้อหา รวมทั้งแก้ไขสำนวนภาษา จากนั้นจึงนำแบบสังเกตมาปรับปรุงแก้ไขให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

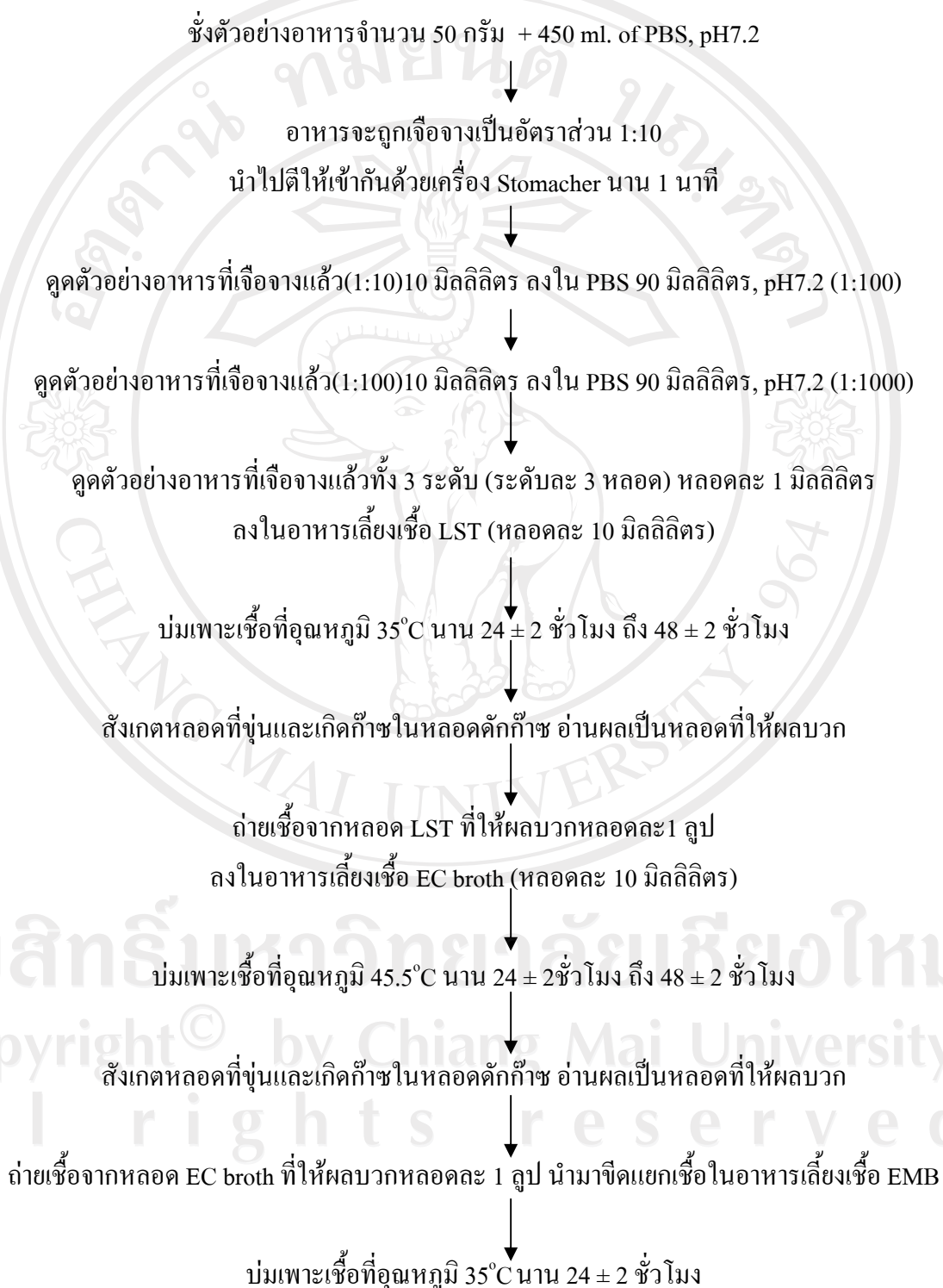
1. สํารวจรายการอาหารที่จําหน่ายในแต่ละวันของร้านจําหน่าย นํามาแบ่งกลุ่มอาหารตามวิธีปรุง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารประเภทต้ม อาหารประเภทผัด อาหารประเภทแกง และอาหารประเภทยำ
2. เก็บตัวอย่างอาหารแบ่งตามวิธีปรุงทั้ง 4 ประเภท การเก็บตัวอย่างอาหารจะไม่มี การแจ้งล่วงหน้า ทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ปรุงเสร็จใหม่ โดยการซื้ออาหารใส่ในภาชนะบรรจุที่แต่ละร้านเตรียมไว้ พร้อมทั้งสังเกตการปฏิบัติตัวของผู้สัมผัสอาหารตามหลักสุขาภิบาลอาหารแบบไม่มีส่วนร่วม ซึ่งสามารถสังเกตผู้สัมผัสอาหารทุกคนได้ จากนั้นนํາอาหารไปห้องปฏิบัติการทันที เพื่อทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบ 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน
3. นําอาหารตัวอย่างที่ได้จากร้านจําหน่ายอาหารปริมาณถูกละประมาณ 500 กรัม ในภาชนะบรรจุที่แต่ละร้านจัดเตรียมไว้ มาแบ่งซ้่ง 50 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
4. เท PBS (Phosphate buffer solution) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ pH7.2 ปริมาณ 450 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างอาหารซ้่ง 1 (อาหารจะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1:10) นําไปตีให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher นาน 1 นาที
5. คูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1:10) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงใน PBS ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ pH7.2 (อาหารจะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 100)
6. คูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้ว (1:100) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงใน PBS จำนวน 90 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ pH7.2 (อาหารจะถูกเจือจางเป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 1000)
7. คูดตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้วทั้ง 3 ระดับ (ระดับละ 3 หลอด) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST (Lauryl Sulphate Tryptose Broth) ภายในหลอดมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณหลอดละ 10 มิลลิลิตร
8. นําไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ถึง 48 ± 2 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ อ่านผลจากหลอดที่ให้ผลบวก
9. เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่ให้ผลบวกให้เข้ากันแล้วใช้หัวเข็มเย็บเย็บเชื้อถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอดๆละ 1 หัว ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth (Escherichia coli broth) ภายในหลอดมีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณหลอดละ 10 มิลลิลิตร นําไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45.5°C นาน 24 ± 2 ถึง 48 ± 2 ชั่วโมง หลอดที่ให้ผลบวกคือ หลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ อ่านผลจากหลอดที่ให้ผลบวก

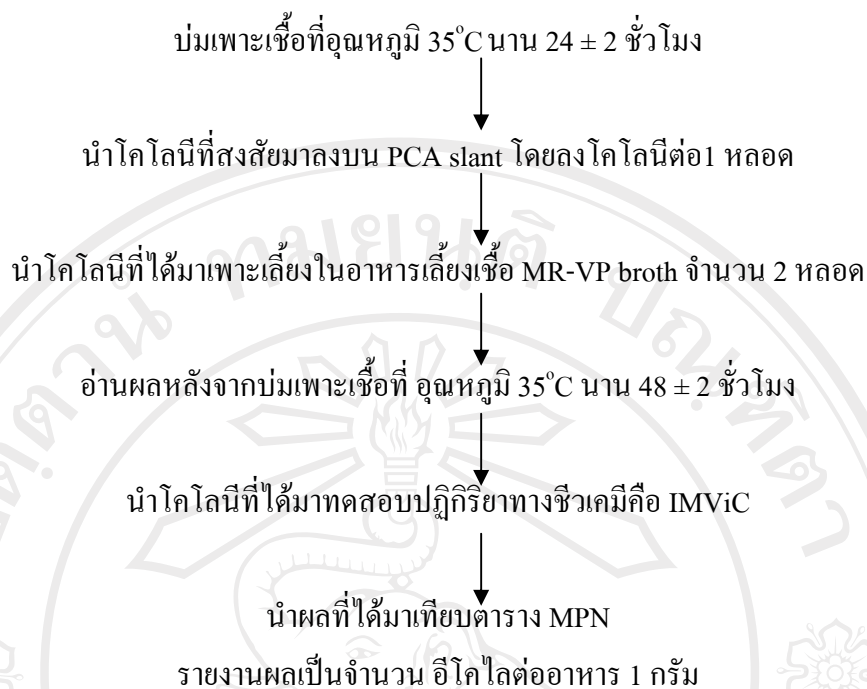
10. ใช้ห้วงเชื้อเชื้อ จุ่มลงในหลอด EC broth ที่ให้ผลบวกและเขย่าให้เข้ากัน นำมาจืดแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB (Eosine Methylene Blue Agar) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง
11. นำโคโลนีที่สงสัยมาลงบน PCA slant (Plate Count Agar Slant) โดยลงโคโลนีต่อ 1 หลอด เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ
12. นำโคโลนีที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP broth จำนวน 2 หลอด อ่านผลหลังจากบ่มเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง
13. นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีคือ IMViC (I = Indole production, M = Methyl red-reactive compounds, Vi = Voges-Prokanev (VP)-reaction compounds, C = Citrate)
14. นำผลที่ได้มาเทียบตาราง MPN รายงานผลเป็นจำนวน อีโคไลต่ออาหาร 1 กรัม

ตาราง 3.1 แสดงขั้นตอนปฏิกิริยา IMViC

ขั้นตอนการตรวจ	วิธีการ	การอ่านผล
I = Indole production	เพาะเลี้ยงเชื้อใน tryptone broth นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ± 2 ชั่วโมง ทดสอบ indole โดยการหยด Kovacs reagent ปริมาณ 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร	ผลบวก เกิดชั้นสีแดงที่ส่วนบนของอาหาร เลี้ยงเชื้อ ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสีเหลือง
Methyl red - reactive compounds	บ่มหลอด MR-VP broth ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง แล้ว เติม สารละลาย Methyl red ประมาณ 5 หยด	ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสีเหลือง
Voges - Prokanev (VP)-reaction compounds	เพาะเลี้ยงเชื้อลงใน MR-VP นำไป บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ± 2 ชั่วโมง หลังจากให้ดู สารละลายลงในหลอดทดลอง จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย alpha- naphthol 0.6 มิลลิลิตร และ 40%KOH จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เขย่า ให้เข้ากัน เติมผลึก creatine จำนวน เล็กน้อย	ผลบวก สารละลายเป็นสีชมพู ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสีเหลือง
Citrate	ถ่ายเชื้อลงใน Simmon's citrate บ่มเพาะเชื้อที่ อุณหภูมิ 35°C นาน 96 ± 2 ชั่วโมง	ผลบวก สารละลายเป็นสีน้ำเงิน ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อเกิด สีเขียว

แผนภูมิ 3.1 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร (E. coli) โดยวิธี MPN (Most probable number ระบบ 3,3,3)





การสรุปผลว่าเป็นเชื้อ *E. coli* มีองค์ประกอบ 3 ประการคือ

1. เชื้อมีการสร้างก๊าซ lactose ภายใน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35°C
2. เชื้อติดแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนและไม่สร้าง spore
3. ให้ผล IMViC + + - - (biotype I) หรือ - + - - (biotype II)

ตาราง 3.2 จำนวนหลอดทดสอบที่ให้ผลบวกในตัวอย่างอาหารที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10
1:100 และ 1:1000 และแปลผลเป็น MPN ต่ออาหาร 1 กรัม

1:10	1:100	1:1000	MPN	1:10	1:100	1:1000	MPN
0	0	0	<3	2	0	0	9.1
0	0	1	3.0	2	0	1	14.0
0	0	2	6.0	2	0	2	20.0
0	0	3	9.0	2	0	3	26.0
0	1	0	3.0	2	1	0	15.0
0	1	1	6.1	2	1	1	20.0
0	1	2	9.2	2	1	2	27.0
0	1	3	12.0	2	1	3	34.0
0	2	0	6.2	2	2	0	21.0
0	2	1	9.3	2	2	1	28.0
0	2	2	12.0	2	2	2	35.0
0	2	3	16.0	2	2	3	42.0
0	3	0	9.4	2	3	0	29.0
0	3	1	13.0	2	3	1	36.0
0	3	2	16.0	2	3	2	44.0
0	3	3	19.0	2	3	3	53.0
1	0	0	3.6	3	0	0	23.0
1	0	1	7.2	3	0	1	39.0
1	0	2	11.0	3	0	2	64.0
1	0	3	15.0	3	0	3	95.0
1	1	0	7.3	3	1	0	43.0
1	1	1	11.0	3	1	1	75.0
1	1	2	15.0	3	1	2	120.0
1	1	3	15.0	3	1	3	160.0
1	2	0	11.0	3	2	0	93.0
1	2	1	15.0	3	2	1	150.0

ตาราง 3.2 (ต่อ)

1:10	1:100	1:1000	MPN	1:10	1:100	1:1000	MPN
1	2	2	20.0	3	2	2	210.0
1	2	3	24.0	3	2	3	290.0
1	3	0	16.0	3	3	0	240.0
1	3	1	20.0	3	3	1	460.0
1	3	2	24.0	3	3	2	1,100.0
1	3	3	29.0	3	3	3	>1,100.0

การรวบรวมข้อมูล

ผู้ศึกษาทำการเก็บรวบรวมข้อมูลด้วยตนเองและมีผู้ช่วยซึ่งเป็นผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจตัวอย่างอาหารทางด้านงานจุลชีววิทยาทางอาหารจาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ โดยดำเนินการตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. สํารวจรายการอาหารที่จำหน่ายในแต่ละวันที่ร้านจำหน่าย ตามวิธีปรุง 4 ประเภท ได้แก่ อาหารประเภทต้ม อาหารประเภทผัด อาหารประเภทแกง และอาหารประเภทยำ
2. ใช้การสังเกตแบบมีโครงสร้าง เนื้อหาครอบคลุมทั้งด้านบุคคลและด้านสิ่งแวดล้อม เพื่อสังเกตการปฏิบัติตัวตามหลักสุขาภิบาลอาหาร โดยสังเกตผู้สัมผัสอาหารทุกคน
3. เก็บตัวอย่างอาหารตามวิธีปรุงทั้ง 4 ประเภท จากร้านจำหน่ายอาหารจำนวน 6 ร้าน ระหว่างวันที่ 25 มกราคม ถึงวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2551 เก็บตัวอย่างอาหารในช่วงเวลา 08:00 ถึง 09:00 น. ซึ่งตัวอย่างอาหารที่ปรุงเสร็จใหม่ การซื้ออาหารผู้ขายตักใส่ในถุงพลาสติกซึ่งเป็นภาชนะบรรจุที่แต่ละร้านจัดเตรียมไว้ แล้วนำอาหารไปห้องปฏิบัติการ ทดสอบทางชีวเคมีทันที เพื่อออกรหัสตัวอย่างอาหาร ป้องกันความสับสนและสะดวกต่อการวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการทดสอบ 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน
4. บันทึกผลการทดสอบตัวอย่างอาหารและผลการสังเกตการปฏิบัติตัวตามหลักสุขาภิบาลอาหารลงในแบบบันทึก

ตาราง 3.3 รายการอาหารที่จำหน่ายในร้านอาหารจำนวน 6 ร้าน ในการเก็บตัวอย่างอาหาร ครั้งที่ 1
ในช่วงวันที่ 25 มกราคม ถึงวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2551

ชนิดอาหาร	ประเภทผัด	ประเภทต้ม	ประเภทแกง
ร้านอาหารที่ 1	ผัดหน่อไม้ เต้าหู้ทรงเครื่อง	ต้มจืดหัวผักกาด -	แกงส้มผักรวม แกงไตปลา
ร้านอาหารที่ 2	ผัดเห็ดใส่หมู -	ต้มจืดมะระขี้เหล็ก -	แกงเขียวหวานลูกชิ้น แกงจืดเห็ด
ร้านอาหารที่ 3	ผัดต้นหอม	ต้มจืดวุ้นเส้น	แกงเขียวหวานไก่
ร้านอาหารที่ 4	ผัดถั่วงอก กระเพราหมูสับ	ต้มจืดวุ้นเส้นหมูสับ -	แกงเขียวหวานไก่ แกงเผ็ดปลาดุก
ร้านอาหารที่ 5	ผัดผักกาด ผัดวุ้นเส้นใส่กุ้ง	ต้มจืดหัวผักกาด -	แกงแคไก่ แกงผักกาด
ร้านอาหารที่ 6	กระเพราหมูสับ	ต้มไข่พะโล้	พะเนียงหมู
รวมจำนวน	9 ตัวอย่าง	6 ตัวอย่าง	10 ตัวอย่าง

ตาราง 3.4 รายการอาหารที่จำหน่ายในร้านอาหารจำนวน 6 ร้าน ในการเก็บตัวอย่างอาหารครั้งที่ 2 ในช่วงวันที่ 6 - 20 กุมภาพันธ์ 2551

ชนิดอาหาร ร้านอาหาร	ประเภทผัด	ประเภทต้ม	ประเภทแกง
ร้านอาหารที่ 1	กระเพราหมูสับ ผัดฟักทองใส่ไข่	ต้มจืดผักกาดดอง -	แกงไตปลา -
ร้านอาหารที่ 2	ผัดผักกาด -	ต้มจืดเต้าหู้ไข่ -	แกงผักกาด แกงหน่อไม้ดอง แกงเขียวหวานไก่
ร้านอาหารที่ 3	ผัดถั่วฝักยาวใส่ลูกชิ้น -	ต้มจืดผักกาดขาว -	แกงขี้เหล็ก แกงหน่อไม้ดอง
ร้านอาหารที่ 4	ผัดเผ็ดปลา ผัดผักกาดใส่หมู	ต้มจืดเต้าหู้หมูสับ ต้มไข่พะโล้	แกงแคหมู -
ร้านอาหารที่ 5	ผัดผักกาดดองใส่วุ้นเส้น -	ต้มจืดวุ้นเส้นใส่เต้าหู้ไข่ -	แกงเขียวหวานไก่ แกงเผ็ดปลาดุก
ร้านอาหารที่ 6	กระเพราหมูสับ ผัดแตงกวาใส่กุ้ง	ต้มจืดสาหร่ายใส่ เต้าหู้ไข่	แกงเขียวหวาน มะพร้าวอ่อน
รวมจำนวน	9 ตัวอย่าง	7 ตัวอย่าง	10 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

การศึกษาครั้งนี้วิเคราะห์ผลการตรวจหาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารปรุงสำเร็จโดยใช้สถิติ ค่าร้อยละ