บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Staphylococcus aureus

1. ลักษณะทั่วไป

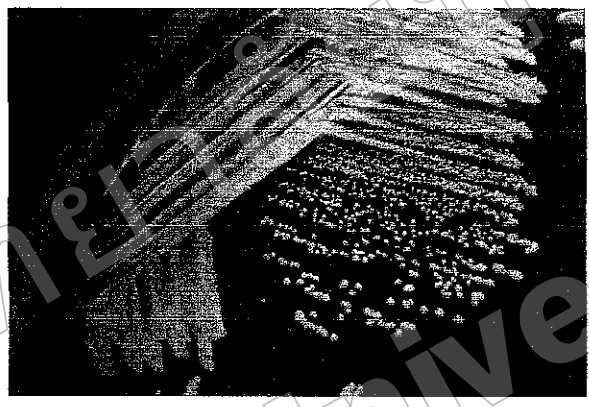
S. aureus เป็นสมาชิกหนึ่งของสกุล *Staphylococcus* จัดเป็นแฟคัลเตทีฟแอนแอโรบ (Facultative Anaerobe) แกรมบวก รูปกลม เรียงตัวเป็นรูปพวงองุ่น ขนาด 0.5-1.0 ไมโครเมตร ให้ผลคะตะเลส (Catalase) บวก และออกซิเดส (Oxidase) ลบ (Eley, 1996) มีบางสายพันธุ์สร้างแคปซูลหรือเมือก (Slime) ช่วยให้เพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545) สามารถเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดได้กรดแล็กติกแต่ไม่ได้ก๊าซ ต้องการกรดอะมิโนและวิตามินในการเจริญ (Martin & Myers, 1994) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) มีลักษณะเรียบ นูน ขาว กลม มีสีขาวเทา หรือเทา บางทีเหลืองส้ม ถึงส้ม โคโลนีบน (ภาพที่ 1A.) เนื่องจาก *S. aureus* สร้างสีบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสีจะปรากฏหลังจากการเจริญ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Martin & Myers, 1994) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ เช่น Baird Parker Agar (BPA) โคโลนีมีลักษณะสีเทาเข้มถึงดำ ขอบโคโลนีมีสีขาวขุ่นและพบบริเวณใสโดยรอบ ผิวโคโลนีเรียบมัน (ภาพที่ 1B.) (Capita, Alonso-Calleja, Garcia-Fernandez, & Moreno, 2002)

โดยทั่วไป *S. aureus* สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 7-47 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0-9.8 สำหรับพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7 แต่อาจขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์อื่น ๆ ด้วย ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (Water Activity [a_w]) ที่เจริญได้ค่อนข้างต่ำกว่าแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีช่วงของค่าวอเตอร์แอกทิวิตีในการเจริญ 0.83-0.99 และเจริญได้ดีที่สุดที่ 0.99 ส่วนการเจริญที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำนั้นขึ้นอยู่ว่าสภาวะอื่นเหมาะสมหรือไม่ (Bremer et al., 2004) ปัจจัยทางกายภาพที่จำกัดการเจริญของ *S. aureus* แสดงในตารางที่ 1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลจำกัดการเจริญของ *S. aureus* (Bremer et al., 2004)

Min. a_w	Min. pH	Max. pH	Max % Salt	Min. Temp (°C)	Max. Temp (°C)	Oxygen Requirement
0.83	4.0	9.8	7-10	6-7	45-47	Facultative
			up to 20			Anaerobe



A.

B.

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของ *S. aureus*

A. บนจานอาหาร Tryticase Soy Agar

B. บนจานอาหาร Baird Parker Agar

S. aureus เป็นแบคทีเรียที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ตามฝี หนอง สิว บาดแผลที่อักเสบ และปนเปื้อนมากับสัตว์ที่มีการสุขาภิบาลไม่ดีหรือพบอยู่ตามผิวหนัง ผม ขนของมนุษย์และสัตว์ โดยแหล่งที่มีความชื้นพบจำนวนถึง 10^3-10^6 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ส่วนในแหล่งที่แห้งอาจพบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ได้ในจำนวน 10-10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Jay, 2000) *S. aureus* มีความใกล้ชิดกับมนุษย์มาก โดยอาศัยอยู่ร่วมกับร่างกายมนุษย์ เช่น จมูก คอ ผิวหนัง การที่ *S. aureus* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้นั้นเป็นเพราะว่าในการปฏิบัติงานไม่มีการป้องกันผู้ที่ติดเชื้อออกจากที่ทำงาน เช่น ผู้ที่มีปัญหาเป็นผื่นตามตัว มีการอักเสบ และเป็นแผล ซึ่ง *S. aureus* เหล่านี้จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในที่สุด (Bremer et al., 2004) ดังนั้นผู้เตรียมอาหารและผู้ให้บริการเคลื่อนย้ายอาหารจึงมีโอกาสแพร่ *S. aureus* มาสู่อาหารได้มาก

จากการที่ *Staphylococcus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับโฮสท์ได้ และมีความใกล้ชิดกับผิวหนังตามร่างกาย จึงทำให้ร่างกายมนุษย์เป็นแหล่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหารที่ประกอบเอง หรืออาจมาจากการที่สัตว์เลี้ยงเป็นโรคแล้วไม่ทราบ เช่น การเกิดเต้านมอักเสบของวัว แล้วมีการรีดนมไปบริโภคหรือใช้ทำชีส ก็จะส่งผลต่อการเกิดโรคได้

นอกจาก *S. aureus* แล้วยังพบ *S. cohnii* ตามผิวหนังมนุษย์ได้เช่นกัน โดยเฉพาะในท่อนำปัสสาวะและแผลพุพอง นอกจากนี้ผิวหนังของมนุษย์ยังเป็นที่อยู่อาศัยของทั้ง *S. epidermidis* และ *S. haemolyticus* ด้วย ส่วนสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ก็พบว่าเป็นที่อยู่อาศัยของ *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* และ subsp. *coagulans* ซึ่งแยกได้จากการติดเชื้อในผิวหนังสุนัข *S. aureus* subsp. *anaerobicus* เป็นสาเหตุการเกิดโรคในแกะ และ *S. delphini* ที่ถูกค้นพบในปลาโลมา *S. sciuri* พบบนผิวหนังของสัตว์ฟันแทะ ส่วน *S. lentus* และ *S. caprae* อยู่ร่วมกับแพะ และพบในนมแพะ (Jame, 2000)

2. การจำแนก *Staphylococcus* (Bergdoll, 1989)

จากการศึกษาเริ่มแรก แบคทีเรียในกลุ่ม Micrococcaceae ที่ทำให้เกิดโรคพบเป็นแบคทีเรียรูปกลม 2 ลักษณะ คือ รูปกลมเป็นสายยาว เรียกว่า *Streptococcus* และรูปกลมเป็นกลุ่มเรียกว่า *Staphylococcus* ในลักษณะหลังนี้ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *S. aureus* ซึ่งมีโคโลนีสีเหลืองและ *S. albus* มีโคโลนีสีขาว (Ogston, 1880 cited in Bergdoll, 1989) นอกจากนี้ยังมี *Staphylococcus* ชนิดอื่น ๆ อีก แต่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม *Micrococcus* ซึ่งต่อมาก็ถูกแยกออกมา เนื่องจาก *Staphylococcus* นั้นสามารถเจริญและผลิตกรดจากกลูโคสในสภาวะไม่มีออกซิเจน ส่วน *Micrococcus* ไม่สามารถผลิตได้ และมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความแตกต่างของ 2 กลุ่มนี้ ทั้งในส่วนขององค์ประกอบเซลล์ โครงสร้างผนังเซลล์ ไซโตโครม (Cytochrome) เป็นต้น จึงทำให้จำนวนสปีชีส์ของ *Staphylococcus* เพิ่มมากขึ้น (Faller & Schkifer, 1981 cited in Bergdoll, 1989)

เดิมการจำแนกระหว่าง *S. albus* และ *S. aureus* อาศัยการสร้างเม็ดสี (Pigment) ในเวลาต่อมาการจำแนกโดยวิธีนี้ไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากการสร้างเม็ดสีของเชื้อมีโอกาสเปลี่ยนแปลงตามสภาวะที่เลี้ยงเชื้อนั้น โดยพบว่า *S. albus* เป็นชนิดเดียวกับ *S. aureus* จากการค้นพบ *S. aureus*

ในเวลาต่อมาได้มีการรายงานถึง *Staphylococcus* ชนิดที่พบเป็นอันดับสอง คือ *S. epidermidis* และอันดับสามคือ *S. saprophyticus* โดยทั้งสามชนิดจำแนกออกจากกันด้วยความแตกต่างระหว่างการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสเป็นหลัก จากนั้นจึงมีการศึกษาถึงการจำแนกในสกุล *Staphylococcus* กันอย่างแพร่หลาย ทำให้ปัจจุบันพบ *Staphylococcus* ถึง 13 ชนิดซึ่งทั้งหมดให้ผลโคแอกกูเลสลบ ยกเว้น *S. intermedius* และ *S. hyicus* ที่สามารถให้ผลโคแอกกูเลสเป็นบวกหรือลบก็ได้ (ตารางที่ 2) ซึ่งก่อนที่จะพบ *Staphylococcus* สองชนิดนี้นั้น มีเพียง *S. aureus* เท่านั้นที่ให้ผลโคแอกกูเลสบวกและผลิตทีเอ็นเอส (Thermonuclease [TNase]) (Bergdoll, 1989)

ตารางที่ 2 สมบัติของ *Staphylococcus* แต่ละชนิด (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545; Jame, 2000)

สมบัติ	ชนิดของ *Staphylococcus*				
	S. aureus	*S. intermedius*	*S. hyicus*	*S. epidermidis*	*S. saprophyticus*
การสร้างเม็ดสี	+	-	-	-	-
โคแอกกูเลส	+	+	+/-	-	-
ทีเอ็นเอส	+	+	+	-	-
ฮีโมไลซิส	+	+	-	+/-	-
เฟอร์เมนต์น้ำตาลแมนนิทอล*	+	-	-	-	-

*เฟอร์เมนต์ในสภาวะไร้ออกซิเจน

3. การแยกเพาะ *S. aureus* (Bergdoll, 1989)

โดยทั่วไปเหตุผลที่มีการตรวจสอบการปนเปื้อน *Staphylococcus* ของอาหารนั้นเพื่อยืนยันให้ทราบแน่ชัดว่าการเกิดอาหารเป็นพิษมีสาเหตุมาจาก *Staphylococcus* หรือไม่ เพื่อพิสูจน์ว่าอาหารชนิดใดเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ หรือจำแนกว่าการปนเปื้อนนั้นเกิดขึ้นก่อนหรือหลังกระบวนการผลิต ซึ่งวิธีที่ใช้ในการคัดแยก *Staphylococcus* แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับธรรมชาติของอาหารนั้น เช่น ถ้าอาหารนั้นไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรือมีการปนเปื้อน *Staphylococcus* หลังจากกระบวนการผลิต *Staphylococcus* จะไม่ถูกทำลาย ดังนั้นจะใช้วิธีคัดแยกที่ต่างจากอาหารที่ปนเปื้อน *Staphylococcus* ก่อนกระบวนการผลิต เพราะประเภทหลังนี้จะส่งผลให้ *Staphylococcus* ถูกทำลายลงได้ การจำแนกโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสของ *Staphylococcus* เป็นวิธีที่ดีที่สุดเพราะส่วนใหญ่ความสามารถในการผลิตโคแอกกูเลสจะเกี่ยวกับอาหารเป็นพิษ (Breckinridge & Bergdoll, 1971 cited in Bergdoll, 1989) ถึงแม้ว่าอาจพบ *S. aureus* บางสายพันธุ์

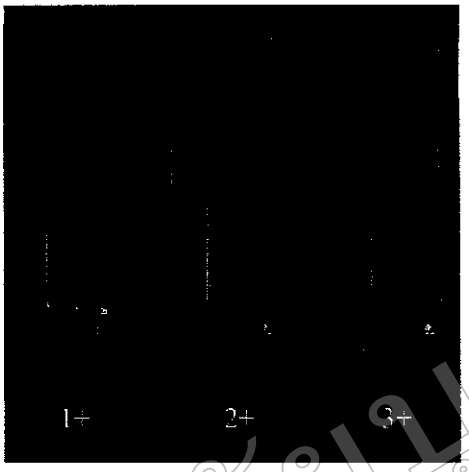
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ให้ผลโคแอกกูเลสลบ แต่ก็เป็นเพียงส่วนน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามการจำแนก *S. aureus* โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสก็ใช้ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เพราะ *S. hyicus* และ *S. intermedius* ก็สามารถผลิตโคแอกกูเลสได้เช่นกัน การที่ *Staphylococcus* ถูกกระทำด้วยสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมในระหว่างกระบวนการผลิตจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้น้อยมาก เมื่อมีการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ เช่น Baird Parker Agar โดยตรง ดังนั้นการตรวจหา *Staphylococcus* ในสภาวะที่ผ่านกระบวนการผลิตนั้นสามารถทำได้โดยเพาะตัวอย่างในอาหารที่สมบูรณ์ (Enrichment Medium) เช่น Trypticase Soy Broth (TSB) ก่อนที่จะมีการเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ โดยทั่วไปจะบ่มตัวอย่างใน Trypticase Soy Broth ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงเพาะลงบนจานอาหาร Baird Parker Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งโคโลนีที่ได้มีขนาดประมาณ 1.5 มิลลิเมตร สีเทาเข้มถึงดำ เรียบ มัน รอบโคโลนีมีสีขาวขุ่นและพบบริเวณใสโดยรอบ (ภาพที่ 1B) และเมื่อนำไปทดสอบโคแอกกูเลสถ้าให้ผลเป็นลบควรทดสอบการผลิตทีเอ็นเอสต่อไป ซึ่งถ้าพบว่าให้ผลอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นบวก สามารถกล่าวได้ว่าเป็น *S. aureus* ชนิดที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ ส่วนการตรวจหา *Staphylococcus* ที่ผลิตโคแอกกูเลสจากอาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการผลิตหรืออาหารที่ปนเปื้อน *Staphylococcus* ภายหลังนั้น สามารถทดสอบได้โดยตรง ด้วยการเพาะบนจานอาหารจำเพาะ บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-48 ชั่วโมง เลือกนับจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 20-200 โคโลนี ที่แสดงลักษณะทั่วไปของ *S. aureus* หรือถ้าพบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างออกไปให้บันทึกไว้ แล้วนำโคโลนีลักษณะดังกล่าวไปทดสอบโคแอกกูเลสหรือทีเอ็นเอส แล้วจึงรายงานผลที่ให้โคแอกกูเลสและทีเอ็นเอสบวกทั้งหมดบนจานอาหารเป็น *S. aureus* ต่อกรัมตัวอย่าง (Bergdoll, 1989)

3.1 การทดสอบโคแอกกูเลส

ถ่ายโคโลนี *S. aureus* จากจานอาหารลงในหลอดทดลองขนาดเล็กที่บรรจุ Brain Heart Infusion (BHI) ประมาณ 0.2-0.3 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน (ขีดเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง เช่น Trypticase Soy Agar ร่วมด้วย เพื่อเป็นการเก็บเชื้อ) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมโคแอกกูเลสพลาสมา (Coagulase Plasma) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด Brain Heart Infusion ที่เลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และนำมาอ่านผลการแข็งตัวของพลาสมา ภายในเวลา 6 ชั่วโมง โดยการแข็งตัวของพลาสมารายงานผลได้เป็น 1+, 2+ และ 3+ (ภาพที่ 2) ซึ่งในกรณี 2+ และ 3+ จะตัดสินให้เป็นโคแอกกูเลสบวกได้ในทันที ส่วนในกรณีที่ 1+ ควรนำไปทดสอบทีเอ็นเอสต่อ (Bennett & Lancette, 1998)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาโคแอกกูเลสที่ระดับต่าง ๆ (Bergdoll, 1989)

3.2 การทดสอบทีเอ็นเอส

การทดสอบทีเอ็นเอสนั้นเป็นวิธีสำหรับยืนยันต่อจากโคแอกกูเลสในกรณีที่ *S. aureus* ให้ผลโคแอกกูเลสไม่สมบูรณ์ (1+) โดยเกลี่ย Toluidine Blue-Deoxyribonucleic Acid Agar ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เมื่อแผ่นวุ้นแข็ง ตัดแผ่นวุ้นออกเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ให้เป็นหลุม จากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้มแล้ว (ส่วนของเชื้อที่เลี้ยงใน Brain Heart Infusion สำหรับทดสอบโคแอกกูเลสไปต้มเดือดนาน 15 นาที) ลงในหลุมที่เจาะไว้บนสไลด์ประมาณ 0.01 มิลลิลิตร บ่มสไลด์ที่กล่องความชื้น 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี จากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูอ่อน มีวงกว้างอย่างน้อย 1 มิลลิเมตร จากขอบของหลุม ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าให้ผลเป็นบวก (Bennett & Lancette, 1998)

4. องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545)

4.1 โครงสร้างที่ผนังเซลล์

องค์ประกอบผนังเซลล์แบคทีเรียทำหน้าที่ต่อต้านกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Phagocytosis) ทำให้เชื้อได้เปรียบโฮสท์ *Staphylococcus* ที่มีแคปซูล (Capsule) จะป้องกันไม่ให้เม็ดเลือดขาวชนิดพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ลิวโคไซต์ (Polymorphonuclear Leucocyte [PMN]) มาจับกิน ทำให้เชื้อแพร่กระจายในเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีโปรตีนเอ (Protein A) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เชื่อมอยู่ระหว่างเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งพบว่าจะถูกหลั่งออกมาในอาหารได้ร้อยละ 8-30 ในระหว่างการเจริญ (Chang & Huang, 1995; Boynukara, Gurturk, Ekin & Ogun, 1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 เอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular Enzyme)

4.2.1 โคแอกกูเลส (Coagulase) หรือฟรีโคแอกกูเลส (Free Coagulase)

โคแอกกูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว โดยการเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) บทบาทของโคแอกกูเลสทำให้เกิดไฟบรินมาล้อมรอบเชื้อ จึงป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโตซิส

4.2.2 ลิเพส (Lipase)

Staphylococcus มีเอนไซม์ลิเพสสำหรับย่อยซับสเตรตหลายชนิด เช่น พลาสมา ไขมัน (Fat & oil) ที่สะสมอยู่ที่ผิวหนัง การที่เชื้อใช้สารเหล่าได้ทำให้มันอยู่รอดได้ และเป็นการอธิบายถึงการรวมกลุ่ม (Colonization) ของเชื้อที่ต่อมเหงื่อ การสร้างลิเพส จึงจำเป็นต่อการบุกรุกของเชื้อเข้าสู่ผิวหนัง

4.2.3 ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase)

ไฮยาลูโรนิเดสเป็นเอนไซม์ย่อยกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic Acid) ซึ่งเป็นมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์กรด (Acid Mucopolysaccharide) ที่อยู่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำให้เชื้อแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น และ *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 90 สร้างเอนไซม์นี้ได้

4.2.4 สแตฟฟิโลไคเนส (Staphylokinase) หรือไฟบริโนไลซิน (Fibrinolysin)

สแตฟฟิโลไคเนสเป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินทำให้เลือดไม่แข็งตัว มีสมบัติทางแอนติเจนและเอนไซม์แตกต่างจากสเตรปโตไคเนส (Streptokinase) ของ *Streptococcus* การสร้างสแตฟฟิโลไคเนสขึ้นอยู่กับยีโนมของฟาจ *S. aureus* ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์นี้ได้

4.2.5 นิวคลีเอส (Nuclease)

นิวคลีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อน ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเจริญของ *S. aureus* เมื่อให้ความร้อน 65 องศาเซลเซียส จะทำลายโครงสร้างนี้ได้ แต่ปฏิกิริยานี้สามารถกลับคืนได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า สามารถอยู่รอดได้ในน้ำเดือดได้นานถึง 30 นาที โดยที่กิจกรรมไม่ลดลง

4.3 ทอกซิน (Toxin)

S. aureus สร้างสารพิษได้หลายชนิด ได้แก่ ไซโทไลติกทอกซิน เอนเทอโรทอกซิน เอกซ์โฟลิเอทีฟทอกซิน (Exfoliative Toxin)

4.3.1 ไซโทไลติกทอกซิน

ไซโทไลติกทอกซินที่สร้างโดย *S. aureus* ได้แก่ ฮีโมไลซิน (Hemolysin) และลิวโคซิดิน (Leukocidin) ซึ่งฮีโมไลซินยังจำแนกเป็น 4 ชนิด คือ แอลฟาฮีโมไลซิน บีตาฮีโมไลซิน เดลตาฮีโมไลซิน และแกมมาฮีโมไลซิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.3.1.1 แอลฟาฮีโมไลซินหรือแอลฟาทอกซิน (α-Hemolysin หรือ α-Toxin)

แอลฟาทอกซินเป็นสารโปรตีนที่ย่อยเม็ดเลือดแดง และทำลายเกล็ดเลือด (Blood Platelet) ของคน แต่ไม่ทำลายโมโนไซต์ ผลของทอกซินทำลายกล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์ผิวหนัง ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเกร็ง ทอกซินบริสุทธิ์เป็นโมโนเมอร์ที่ละลายน้ำมีขนาด 34,000 ดาลตัน เมื่อมาสัมผัสกับตัวรับบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์จะเรียงตัวเป็นเฮกซาเมอร์ ดังนั้นกลไกการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เชื่อว่ามีลำดับดังนี้

4.3.1.1.1 ทอกซินในรูปโมโนเมอร์ไปจับผิวเซลล์

4.3.1.1.2 รวมตัวกันใหม่เป็นรูปเฮกซาเมอร์เพื่อเป็นช่องขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 นาโนเมตร

4.3.1.1.3 เกิดการรั่วของไอออนขนาดเล็กผ่านช่องนั้น

4.3.1.1.4 เกิดการแตกของเซลล์เนื่องจากออสโมซิส

4.3.1.2 บีตาฮีโมไลซินหรือบีตาทอกซินหรือสแตฟฟิโลค็อกคัล สฟิงโกไมอิลิเนส (β-Hemolysin หรือ β-Toxin หรือ Staphylococcal Sphingomyelinase)

บีตาทอกซินทำให้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ถ้าบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และตามด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Hot Cold Hemolysin) ทอกซินสามารถย่อยสลายสฟิงโกไมอีลินให้เป็นเอ็น-เอซิลสฟิงโกซีน (N-Acylsphingosine) และฟอสโฟรีลโคลีน (Phosphoryl Choline) จึงทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อนำไปแช่เย็น

4.3.1.3 เดลตาฮีโมไลซินหรือเดลตาทอกซิน (δ-Hemolysin หรือ δ-Toxin)

เดลตาทอกซินค่อนข้างทนความร้อน สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง แมโครฟาจ ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) นิวโทรฟิล (Neutrophill) และเกล็ดเลือด นอกจากนี้ยังยับยั้งการดูดน้ำกลับที่ลำไส้เล็กส่วนไอเลียม (Ileum) กระตุ้นการสะสม AMP และเปลี่ยนแปลงสมบัติการให้ไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลำไส้เล็กส่วนไอเลียมของหนูตะเภา

4.3.1.4 แกมมาฮีโมไลซินหรือแกมมาทอกซิน (γ-Hemolysin หรือ γ-Toxin)

แกมมาทอกซินประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วนแยกกัน ทอกซินนี้ทำลายเม็ดเลือดแดงของกระต่าย คนและแกะ แต่ไม่มีผลกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีก

4.3.1.5 ลิวโคซิดิน (Leukocidin หรือ Panton-Valentine Leukocidin)

S. aureus ส่วนใหญ่สร้างลิวโคซิดินซึ่งทำลายเม็ดเลือดขาวชนิดพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ลิวโคไซต์ และแมโครฟาจแต่ไม่มีผลกับเซลล์ชนิดอื่น ลิวโคไซต์ประกอบด้วยโปรตีน 2 ส่วน คือ ส่วน S และส่วน F ทำงานร่วมกัน ส่วน S จับกับแกงกลิโอไซด์ (Ganglioside) GM1 และไปกระตุ้นฟอสโฟลิเปส A_2 ที่จับบนเยื่อหุ้มเซลล์ ผลที่ได้นี้จะไปจับกับส่วน F แล้วกระตุ้นให้เกิดช่องว่างที่เมมเบรนทำให้เซลล์แตก

4.3.2 เอนเทอโรทอกซิน

เอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* เป็นเอกโซทอกซินที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (Gomez-Lucia et al., 1992) ซึ่งมีอาการท้องร่วงรุนแรงและอาเจียน เอนเทอโรทอกซินนี้ประกอบด้วยกลอบิวลาร์โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 28,000-35,000 ดาลตัน มีอยู่ 10 ชนิด คือ A, B, C_1, C_2, C_3, D, E, G, H, และ I และชนิดที่ทำให้เกิด Toxic Shock Syndrome จึงเรียกว่า Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) ซึ่งทอกซินนี้ทำให้เกิดอาการไข้และช็อก เอนเทอโรทอกซินทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที และทนต่อน้ำย่อยในทางเดินอาหาร การทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ พบว่าจะเกิดเมื่อ *S. aureus* เจริญในอาหารโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต โดยทอกซินอาจมีผลไปกระตุ้นศูนย์กลางการอาเจียนที่ระบบประสาทส่วนกลาง และไปยับยั้งการดูดน้ำกลับจากลำไส้จึงทำให้ขับถ่ายของเหลวออกมามาก

4.3.3 เอกซ์โฟลิเอทีฟทอกซิน หรืออีพิเดอร์โมไลติกทอกซิน (Exfoliative Toxin หรือ Epidermolytic Toxin, ET)

เป็นทอกซินที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์ที่เกาะติดกันระหว่างเซลล์ของชั้นหนังกำพร้า (ชั้น Stratum Granulosum) จึงทำให้ผิวหนังหลุดออก แต่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบหรือไม่ทำให้เซลล์ตาย ทอกซินของเชื้อ *S. aureus* มี 2 ชนิด คือ ETA และ ETB ซึ่งสารโปรตีนทอกซินนี้ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2545)

5. การรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bergdoll, 1989)

มีการศึกษาผลของสภาวะที่แตกต่างกันต่อการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ผลของความร้อน พีเอช วอเตอร์แอกทิวิตี โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) น้ำตาล และสารเคมีที่จำเป็น แต่อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหารก็อาจให้ผลแตกต่างกันออกไป

โดยทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น *S. aureus* จะไม่สามารถทนความร้อนได้ โดยถูกทำลายที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส จากการทดลองนำ *S. aureus* ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด จำนวนเซลล์ $6x10^6$-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์สภาพเป็นกลาง (Neutral Phosphate Buffer) พบว่า *S. aureus* ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ภายใน 4-24 นาที ที่อุณหภูมิ 54-60 องศาเซลเซียส (Warren, Sugiyama, & Prohaska, 1963 cited in Bergdoll, 1989) ซึ่งหาค่า D (เวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ให้ลดลงร้อยละ 90) ของ *S. aureus* ได้ 2.55 นาที ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ส่วน *S. aureus* ที่ทนร้อนได้นั้นขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลายที่นำไปให้ความร้อน เช่น *S. aureus* สายพันธุ์ MF31 ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 6.5 นั้นสามารถรอดชีวิตได้นานกว่าที่พีเอช 4.5 โดยมีค่า D ที่ 48.9 องศาเซลเซียส เท่ากับ 12.1 และ 9.5 นาที ตามลำดับ ส่วนค่า D

ที่ 62.8 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 1.1 และ 0.4 นาที ตามลำดับ และเมื่อนำ *S. aureus* สายพันธุ์ดังกล่าวใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ไปให้ความร้อนที่ 54.4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า เชื้อรอดชีวิตน้อยกว่าร้อยละ 1 (Stiles & Witter, 1965 cited in Bergdoll, 1989)

อายุของเซลล์ก็มีผลต่อการทนความร้อนเช่นกัน ซึ่งการทนความร้อนของเซลล์จะมากขึ้นเมื่อเซลล์มีอายุระหว่าง 12-60 ชั่วโมง และดีที่สุดเมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะพักตัว (Stationary Phase) สำหรับการแช่แข็ง-การละลาย (Freezing-Thawing) นั้นมีผลต่อ *S. aureus* เพียงเล็กน้อย เช่น *S. aureus* สายพันธุ์ FRI-100 ที่เก็บใน Trypticase Soy Broth ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่ามีความไวต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 มากกว่าเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ไวกว่าในระดับที่น้อยมาก (Minor & Marth, 1972 cited in Bergdoll, 1989) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการแช่แข็งอาจทำให้เซลล์เสียหายได้แต่ไม่ฆ่าเซลล์ โดยอาจเป็นการเสียหายของเยื่อหุ้มและเกิดการเปลี่ยนแปลงของเมตาบอลิซึมหรือกิจกรรมเอนไซม์แต่เชื้อก็สามารถเจริญได้อีกครั้งในอาหารที่สมบูรณ์ สำหรับ *S. aureus* ที่บ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะเจริญได้น้อย ถ้าบ่มในอาหารที่มีพีเอช 4 หรือ 5 ซึ่งน้อยกว่าบ่มในพีเอช 6, 7 และ 8 การที่ *S. aureus* ผ่านการแช่แข็ง-การละลายนั้นค่าของพีเอชในช่วง 4.3-7.3 จะไม่มีผลทำให้เกิดเซลล์เสียหาย แต่ถ้าเลี้ยงในพีเอช 3.8 จะพบการรอดชีวิตลดลง 10 เท่า ส่วนเซลล์ของ *S. aureus* สายพันธุ์ S-6 ที่เสียหายจากการแช่แข็งนั้นสามารถซ่อมแซมได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำมาวางที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส และการซ่อมแซมจะเกิดได้ช้าถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และไม่เกิดขึ้นเลยถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

สำหรับการเติมเกลืออื่น ๆ เช่น โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ในอาหารนั้น ซึ่งส่งผลให้ *Staphylococcus* เจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับโมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium Glutamate) ก็ส่งผลให้เซลล์เกิดการป้องกันอุณหภูมิสูงได้เช่นกัน สำหรับการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 ก็ส่งผลให้ *Staphylococcus* ทนร้อนได้ที่อุณหภูมิสูงเช่นกัน แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 20 พบว่าสามารถทำลาย *S. aureus* ได้ (Parfentjer & Catelli, 1964 cited in Bergdoll, 1989)

สำหรับผลของน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50-60 นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ แต่เคยมีรายงานว่า *Staphylococcus* สามารถเจริญได้ที่น้ำตาลร้อยละ 50 แต่หลังจาก 24 ชั่วโมง การเจริญถูกยับยั้งเนื่องจากมีกรดเกิดขึ้น ส่วนผลร่วมกันระหว่างโซเดียมคลอไรด์กับ กลูโคสหรือซูโครสที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะส่งผลให้ *Staphylococcus* ทนร้อนได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้น้ำตาลมีผลต่อการปกป้องเซลล์ *S. aureus* ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่ให้เกิด

ความเสียหายขึ้นในระหว่างที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สำหรับสารเคมีอื่น ๆ ที่ปกป้องเซลล์ได้ ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมท กรดอะมิโนที่จำเป็นและแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Smith, Field, & Adams, 1974 cited in Bergdoll, 1989)

การตอบสนองต่อกรดของ *Staphylococcus* มีลักษณะไม่แน่นอน ตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก (Acetic Acid) มีสมบัติทำลายเชื้อได้มากกว่ากรดซิตริก (Citric Acid) กรดแลกติก (Lactic Acid) และกรดทาร์ทาริก (Tartaric Acid) โดยในการบ่ม *S. aureus* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน Trypticase Soy Broth ที่ผสมกรดอะซิติก กรดแลกติก กรดฟอสเฟอริก กรดซิตริก หรือกรดไฮโดรคลอริก ที่มีพีเอช 4.5, 4.4, 4.2, 3.9 หรือ 3.8 ตามลำดับ เชื้อจะถูกยับยั้งถึงร้อยละ 99.9 และเซลล์จะตอบสนองต่อกรดมากขึ้นถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Minor & Marth, 1972 cited in Bergdoll, 1989)

6. การรอดชีวิตของ *S. aureus* ในอาหาร (Bergdoll, 1989)

การเกิดอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่มีการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในระหว่างการเจริญในอาหาร โดยทั่วไปอาหารที่มี *Staphylococcus* ปนเปื้อน เช่น เนื้อ นม พบว่ามีโอกาสเกิดอาหารเป็นพิษได้ต่ำ เนื่องจากมักปนเปื้อนร่วมกับเชื้ออื่น ๆ ด้วย ซึ่ง *Staphylococcus* จะเจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่มีแบคทีเรียหลากหลาย และมักพบว่าถูกยับยั้งการเจริญหรือจุลินทรีย์อื่นเจริญได้เร็วกว่า สำหรับการประกอบอาหารนั้น การให้ความร้อนถึงภายในที่อุณหภูมิ 73.9-76.7 องศาเซลเซียส นั้นสามารถทำลาย *Staphylococcus* ได้ทุกชนิด (Longree, 1972 cited in Bergdoll, 1989) นอกจากนั้นยังมีการรายงานว่า การให้ความร้อนชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ 46.6 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง สามารถลดจำนวน *Staphylococcus* ได้มากกว่าร้อยละ 99 และการให้ความร้อนเนื้อที่อุณหภูมิ 51.1 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ก็สามารถทำลาย *Staphylococcus* ได้อย่างสมบูรณ์เช่นกัน (Brown & Twedt, 1972 cited in Bergdoll, 1989) โดยส่วนใหญ่นั้น การให้ความร้อนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการทำลาย *Staphylococcus* ทุกชนิดลงได้ ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องก็ใช้วิธีให้ความร้อนทำลาย *Staphylococcus* ทุกชนิด แต่ที่ยังพบปัญหาการปนเปื้อนนั้น มักเกิดขึ้นหลังจากการฆ่าเชื้อ โดยอาจเป็นการปนเปื้อนระหว่างการผ่านน้ำเย็นและเกิดการซึมเข้าตามรอยตะเข็บของกระป๋อง และถ้าเก็บไว้อย่างน้อย 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *Staphylococcus* สามารถเจริญได้และผลิตเอนเทอโรทอกซิน (Mansfield, Farkas, Wieneke, & Gilbert, 1983 cited in Bergdoll, 1989) การพาสเจอร์ไรซ์นม สามารถทำลาย *Staphylococcus* ได้ทุกชนิด แต่การปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นหลังจากการพาสเจอไรซ์ได้ มีการศึกษา *S. aureus* ในนมที่ผ่านความร้อนที่ 57.2, 60.0, 62.8, 65.6 หรือ 71.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80, 24, 6.8, 1.9 หรือ 0.14 นาที ตามลำดับ และพบว่า *S. aureus* ถูกทำลายลงได้อย่างสมบูรณ์ แต่ก็มี

รายงานว่า การให้ความร้อน 63.9 องศาเซลเซียส นาน 21 วินาที ส่งผลให้ *Staphylococcus* 116 สายพันธุ์ จาก 236 สายพันธุ์ สามารถรอดชีวิตและสามารถนับจำนวนเซลล์ได้ถึง 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65.6 องศาเซลเซียส นาน 21 วินาที พบ *Staphylococcus* รอดชีวิตได้ 108 สายพันธุ์ และนับเซลล์ได้น้อยกว่า 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Zottola, Al-Dulaimi, & Jezeski, 1969 cited in Bergdoll, 1989)

S. aureus ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่พบจุลินทรีย์อื่นร่วมด้วย เช่น พบการเจริญของ *S. aureus* ได้น้อยหรือไม่พบเลยที่ผิวของเนื้อสด เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1-12.5 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน และที่อุณหภูมิสูงกว่า 18.3 องศาเซลเซียส จะพบแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวของเนื้อสดสามารถเจริญได้เร็วกว่า *Staphylococcus* แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าเนื้อสดถูกชำแหละแบบปลอดเชื้ออื่นก็ส่งผลให้ *Staphylococcus* สามารถเจริญและผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ (Casman, McCoy, & Brandkey, 1963 cited in Bergdoll, 1989) มีการศึกษาผลของการแช่เย็นต่อการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในตัวอย่างก้อนขนมปังที่ผสมเนื้อ โดยใส่เซลล์ปริมาณ $5x10^3$ เซลล์ต่อกรัม และอบก้อนขนมปังให้มีความร้อนถึงภายใน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าหลังจากให้ความร้อนปริมาณเซลล์ลดลง 23-430 เซลล์ต่อกรัม และลดลง 3-19 เซลล์ต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาในตู้เย็น สำหรับการเติมสารเคมีในอาหาร เช่น การเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 ในเนื้อเปื่อยจะเป็นการเพิ่มความสามารถการทนร้อนของ *S. aureus* ได้ (Bunch, Mathews, & Marth, 1977 cited in Bergdoll, 1989)

การเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1-9 ที่ผิวของเนื้อจะเป็นการช่วยป้องกัน *S. aureus* จากความร้อนที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส ได้มากขึ้นส่วนกลูโคสและซูโครสก็ช่วยป้องกันเซลล์ได้เช่นกัน ส่วนการแช่แข็ง-การละลาย มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ *S. aureus* ค่อนข้างน้อย แต่อย่างไรก็ตามถ้าเก็บเนื้อที่สภาวะเกือบแช่แข็งเป็นเวลานานก็สามารถลดการรอดชีวิตของ *Staphylococcus* บนเนื้อได้เช่นกัน การเก็บเนื้อสดบดที่อุณหภูมิ -22 องศาเซลเซียส นาน 4 เดือน สามารถลดจำนวนเซลล์ของ *S. aureus* ได้ร้อยละ 91 ในสภาวะที่แช่แข็ง-ละลายชิ้นเนื้อนั้น *S. aureus* สามารถทนอยู่ได้ที่พีเอช 4.6-6.3 แต่จะลดจำนวนลงถ้ามีพีเอช 4.2 (Demchick, Palumbo, & Smith, 1982 cited in Bergdoll, 1989)

Eddy and Ingram (1962) ศึกษาติดตามการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในเบคอนบรรจุสูญญากาศ พบว่า *Staphylococcus* เจริญได้ขณะที่มีการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ แต่การเจริญจะดีกว่า เมื่อจุลินทรีย์กลุ่มซาโปรไฟติก (Saprophytic) ลดต่ำลงและเก็บที่อุณหภูมิสูง สำหรับการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในตัวอย่างนั้นพบว่ามีจำนวนถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัม นอกจากนี้

S. aureus ที่เจริญบนตัวอย่างดังกล่าวที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส จะถูกยับยั้งได้โดยโพแตสเซียมซอร์เบต (Potassium Sorbate) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยไนไตรท์ (Nitrite) (Eddy & Ingram, 1962 cited in Bergdoll, 1989)

ในเนื้อแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ร้อยละ 85 หลังจากทำแห้งที่อุณหภูมิ 68.3 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง โดยทั่วไป *S. aureus* สามารถเจริญได้ในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตีที่กว้างมากกว่าแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดอื่น และจากสมบัติดังกล่าวจึงมีการศึกษาผลการตอบสนองของ *S. aureus* ที่วอเตอร์แอกทิวิตีต่ำ พบว่า *Staphylococcus* เจริญได้ดีที่สุดที่วอเตอร์แอกทิวิตีมากกว่า 0.99 ความสามารถในการเจริญของ *S. aureus* ที่วอเตอร์แอกทิวิตีต่ำนั้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และพารามิเตอร์อื่น ๆ มีการรายงานว่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำสุดที่ *Staphylococcus* เจริญได้ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน คือ 0.90 ในขณะที่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนค่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำสุดอยู่ที่ 0.83-0.86 (Bergdoll, 1989)

7. เอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus*

7.1 เอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus* (Staphylococcal Enterotoxins [SEs])

SEs เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ระหว่าง 26,000 ถึง 34,000 ดัลตัน อยู่ในรูปโปรตีนสายเดี่ยว ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ไลซีน (Lysine) ไทโรซีน (Tyrosine) แอสปาร์ติก (Aspartic) และกรดกลูตามิก (Glutamic Acid) สามารถละลายน้ำและสารละลายที่มีเกลือ ทนต่อความร้อนได้สูงมาก (Balaban & Rasooly, 2000) นอกจากนี้ SEs ยังเป็นกลุ่มหลักของกลุ่มที่ผลิตสารพิษทนร้อน ทำให้เกิดความเป็นพิษรุนแรง ทั้งในระบบกระเพาะอาหาร-ลำไส้เล็ก ในปี 1998 มีการรายงานว่า SEs ถูกจำแนกได้ทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่ Staphylococcal Enterotoxin A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH) และ I (SEI) ซึ่งทั้งสามชนิดล่าสุด คือ SEH ถูกจำแนกได้ในปี 1994 และ SEG, SEI ถูกรายงานในปี 1998 แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าพบ SEG ในอาหาร (Jay, 2000)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 คุณสมบัติเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus* (Jay, 2000, Su, & Wong, 1997)

Property	Enterotoxin									
	A	B	C_1	C_2	C_3	D	E	G	H	I
Molecular Weight	27,800	28,366	34,100	34,000	26,900	27,300	26,900	27,043	28,500	24,928
Isoelectric Point	6.8	8.6	8.6	7.0	8.15	7.4	7.0	-	5.7	-
Extinction Coefficient ($E^{1\%}_{1cm}$)*	14.3	14.0	12.1	12.1	12.1	10.8	12.5	-	-	-
Emetic Dose (ED_{50}) (µg/ Monkey)	5	5	5	5-10	5-10	20	10-20	-	<30	-
Amino Acid Residues	233	239	239	239	236	238	230	-	218	-
N-Terminal Amino Acid	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Ser	Ser	-	Glu	-
C-Terminal Amino Acid	Ser	Lys	Gly	Gly	-	Lys	Thr	-	Val	-
Nitrogen Content (%)	16.5	16.1	16.2	16.0	-	-	-	-	-	-
Reduce Viscosity (mL/ g)	4.07	3.92	3.4	3.7	-	-	-	-	-	-
Maximum Absorption (nm)	277	277	277	277	-	278	277	-	-	-
Year Identified	1960	1959	1967	1967	1965	1967	1971	1992	1994	1998

* ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Staphylococcal Enterotoxin A (SEA): SEA เป็นเอนเทอโรทอกซินกลุ่มหลักที่ทำให้เกิดปัญหาอาหารเป็นพิษ โดยยีนของ SEA (*entA*) มีพาหะเป็น Temperate Bacteriophage ซึ่งจะแทรกเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย และในลำดับกรดอะมิโนของ SEA มีตำแหน่ง $Zinc^{2+}$ Binding อยู่ด้วย SEA จะแสดงออกในระยะกลางเอกซ์โพเนนเชียส (Mid-Exponential Phase) ของการเจริญ

Staphylococcal Enterotoxin B (SEB): ยีนที่ทำให้เกิดการเป็นพิษของ SEB คือ *entB* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซมของ *S. aureus* ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ (Balaban & Rasooly, 2000)

Staphylococcal Enterotoxin C (SEC): ถูกแยกได้เป็น 3 ชนิด (SEC_1, SEC_2 และ SEC_3) สารพิษในกลุ่มนี้มีความใกล้ชิดกันมากโดย SEC_3 มีลำดับนิวคลิโอไทด์เหมือนกับ SEC_1 ถึงร้อยละ 98 (Jay, 2000) โดยส่วนใหญ่ SEC จะเป็นสารพิษของ *S. aureus* ที่แยกได้จากสัตว์

Staphylococcal Enterotoxin D (SED): เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษอันดับสองรองจาก SEA ยีนของ SED คือ *entD* เป็นยีนที่อยู่บน Penicillinase Plasmid ความรุนแรงของ SED ขึ้นอยู่กับ Zn^{2+} ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรงร่วมกับ MHC Class II โดยตำแหน่งของ Zn^{2+} Binding จะอยู่ที่ β-Cheet ใน C-Terminal

7.2 คุณสมบัติ

คุณสมบัติของสารพิษ สรุปได้ดังตารางที่ 3 โดยลำดับกรดอะมิโนของ SEB ถูกค้นพบเป็นลำดับแรก โดยเอนเทอโรทอกซินชนิดนี้มีกรดอะมิโนที่ปลาย N เป็นกรดกลูตามิก และไลซีนเป็นกรดอะมิโนที่ปลาย C ส่วน SEA SEB และ SEE มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 239-296 กรดอะมิโน และ SEC_3 ประกอบด้วย 236 กรดอะมิโน ซึ่งมีเซอรีน (Serine) เป็นปลาย N ขณะที่ปลาย N ของ SEC_1 คือกรดกลูตามิก ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นเอนเทอโรทอกซินจะทนต่อเอนไซม์กลุ่มโพรติโอไลติก (Proteolytic Enzyme) เช่น ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) เรนนิน (Rennin) และปาเปน (Papain) แต่จะไวต่อเอนไซม์เปปซิน (Pepsin) ที่พีเอชประมาณ 2 ถึงแม้ว่าเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพแตกต่างกันแต่ก็มีความสามารถในการเกิดโรคเหมือนกัน (Jay, 2000)

7.2.1 การทนความร้อน

ความสามารถในการทนร้อนของ SEs ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ ชนิด ปริมาณเริ่มต้นของเอนเทอโรทอกซิน พีเอช ปริมาณความร้อนและวิธีการที่ใช้ตรวจสอบ มีการรายงานว่า SEB คงกิจกรรมไว้ได้นานถึง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 7.3 และ SEB สามารถทนอุณหภูมิน้ำเดือดนาน 30-40 นาที โดยที่กิจกรรมไม่ลดลงและยังเหนี่ยวนำให้เกิดการอาเจียนในลิง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(สัตว์ทดลอง) อีกด้วย (Schantz et al., 1965 cited in Bergdoll, 1989) มีการศึกษาโดยให้ความร้อนกับ SEC นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า SEC ไม่เปลี่ยนแปลงความสามารถในการทำปฏิกิริยากับระบบน้ำเหลือง และพบว่าเมื่อให้ความร้อนกับ SEA ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หรือ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จะสูญเสียความสามารถในการทำปฏิกิริยา

โดยทั่วไปความสามารถในการทนร้อนของ SEA จะสูงกว่า SEB และ SEC ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความสามารถดังกล่าวขึ้นกับชนิดตัวกลางด้วย Denney et al. (1971) พบว่า SEA จะคงกิจกรรมทนร้อนเมื่ออยู่ในน้ำซุปเนื้อ (พีเอช 6) ได้มากกว่าอยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2) ขณะที่ Fung et al. (1973) รายงานว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส SEC ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะสูญเสียกิจกรรมภายใน 60 นาที ซึ่งเร็วกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทนได้นานถึง 180 นาที นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส SEB สามารถทนได้ในช่วง 9.9-11.4 นาที (Denny et al., 1971; Fung et al., 1973 cited in Bergdoll, 1989)

7.2.2 การทนต่อรังสี

เอนเทอโรทอกซินทนต่อรังสีแกมมาได้โดย Modi, Rosec, and Palumbo (1990) พบว่าในเจลลาตินฟอสเฟตบัฟเฟอร์ SEA จะสูญเสียกิจกรรมที่รังสี 8 กิโลเกรย์ ถ้าในร้อยละ 15 ของมินซ์สเลอรี พบว่า SEA ร้อยละ 27-37 คงกิจกรรมไว้ได้ที่ 8 กิโลเกรย์ เช่นกัน

7.2.3 การทนต่อเอนไซม์

SEs ทนเอนไซม์ได้หลายชนิด ในกลุ่มของโพรติโอไลติก เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน เรนนินและปาเปน (พีเอชมากกว่า 2) อย่างไรก็ตาม SEs ก็ไวต่อเปปซินที่พีเอชต่ำกว่า 2 ซึ่งจากความสามารถนี้จึงทำให้เอนเทอโรทอกซินยังคงกิจกรรมไว้ได้ ถึงแม้อาหารจะถูกย่อยแล้วก็ตาม (Martin & Myers, 1994)

7.3 แหล่งที่พบ SEs

โดยทั่วไปพบว่าการระบาดของอาหารเป็นพิษมีสาเหตุจาก SEA มากกว่าชนิดอื่น ๆ รองลงมาคือจาก SED ส่วนที่พบว่ามีการระบาดน้อยที่สุดคือ SEE ซึ่งความสัมพันธ์ในการระบาดของเอนเทอโรทอกซินของแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับแหล่งของตัวอย่าง เช่น ในสหรัฐอเมริกา พบว่าร้อยละ 50 ของ *S. aureus* ที่แยกได้จากมนุษย์ผลิต SEA ชนิดเดียวหรือร่วมกับชนิดอื่น ขณะที่ในศรีลังกาคัดแยก *S. aureus* จากมนุษย์เช่นกัน แต่พบการผลิต SEA เพียงร้อยละ 7.8 เท่านั้น การศึกษาของ Harvey et al. (1982) พบ *S. aureus* ที่ผลิต SED ได้ในเนื้อไก่ถึง 55 ไอโซเลท และการคัดแยก *S. aureus* จากเนื้อไก่ในอาหารพร้อมรับประทานของไนจีเรีย พบ *S. aureus* ผลิตเอนเทอโรทอกซินร้อยละ 39 จาก 248 ไอโซเลท และจากสายพันธุ์ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินทั้งหมด พบว่าร้อยละ 44 ผลิต SED (Harvey et al., 1982 cited in Jay, 2000) ซึ่งต่างจากการรายงานที่คัดแยก *S. aureus* จาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาหารต่าง ๆ ในไนจีเรีย พบสายพันธุ์ที่ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นบวก 449 ไอโซเลท พบว่าผลิต SEA SEB SED และ SEC เป็นร้อยละ 57 15 6 และ 5 ตามลำดับ นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า 2 ใน 3 ของ *S. aureus* ที่แยกได้และผลิตสารพิษได้ช้าจะให้ผลโคแอกกูเลสบวก เพียงเล็กน้อยหรือเป็นลบ และไม่หมักแมนนิทอลในสภาวะไม่มีออกซิเจนนั้นเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต SED (Jay, 2000)

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการพบ *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ที่แยกได้จากแหล่ง ๆ ซึ่งพบว่าการระบาดของ *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินในหมู่บุคคลที่ติดเชื้อจะสูงกว่าบุคคลที่สุขภาพดี ซึ่งโดยทั่วไปในบุคคลที่มีสุขภาพดีจะพบ *Staphylococcus* เพียงร้อยละ 40-50 เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีบางรายงานได้กล่าวถึงการระบาดของ *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินในกลุ่มสัตว์ ซึ่งพบว่าการระบาดเกิดขึ้นได้สูงในกลุ่มสัตว์ที่เป็นโรค เช่น ในแกะที่เป็นโรคเต้านมอักเสบนั้นพบ SEC ถึงร้อยละ 70-80

ตารางที่ 4 *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ (Bergdoll, 1989)

แหล่ง	จำนวน *Staphylococcus*	จำนวนที่พบการผลิตเอนเทอโรทอกซิน (%)
นักเรียน	117	15.4
เด็ก	70	40.0
ผู้ประกอบอาหาร	73	43.8
ผู้ประกอบอาหาร	249	54.2
อาหาร	452	24.6
ไก่	199	4.0
หนู	174	13.8
สุนัข	191	15.7
แกะเป็นเต้านมอักเสบ	64	79.7
วัวเป็นเต้านมอักเสบ	157	13.6
อาหารเป็นพิษ	120	94.2

8. การจำแนกเอนเทอโรทอกซิน (Bergdoll, 1989)

เอนเทอโรทอกซินมีโครงสร้างแบบง่าย มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight) ต่ำ ละลายได้ง่ายในน้ำและสารละลายน้ำเกลือ การใช้พีไอ (Isoelectric Point [pI]) ในการจำแนก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความบริสุทธิ์ของทอกซิน พบว่าเอนเทอโรทอกซินชนิดหนึ่งมีรูปแบบมากกว่า 1 รูปแบบ และมีพีไอที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้มาจากความแตกต่างของหมู่เอไมด์ (Amide Group) ถ้าหมู่เอไมด์หายไป 1 หมู่ก็ส่งผลต่อพีไอลดลงประมาณ 0.4 หน่วยของพีเอช พีไอของ SEA อยู่ที่ 7.0 แต่พบว่าหมู่เอไมด์ไม่มีผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพของเอนเทอโรทอกซินหรือความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี เอนเทอโรทอกซินเป็นพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) สายเดี่ยว องค์ประกอบของกรด อะมิโนใน SEA SED และ SEE มีความคล้ายคลึงกัน ขณะที่ SEB และ SEC_S คล้ายคลึงกัน

9. การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus*

การผลิตเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของเซลล์ เช่น SEA และ SEE ถูกสร้างในช่วงระยะล็อก (Log Phase) ในขณะที่ SEB และ SEC ถูกสร้างในช่วงปลายระยะล็อกหรือระยะพักตัว นอกจากนั้นวอเตอร์แอกทิวิตีและพีเอชมีผลต่อการสร้างเอนเทอโรทอกซิน โดยอาหารที่มีเกลือสูง ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำลง จะทำให้การสร้าง SEB และ SEC ลดลงได้ (Balaban & Rasooly, 2000)

Smith et al. (1983) ศึกษาปัจจัยสำหรับการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินพบว่าขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อ ความเข้มข้นของออกซิเจน อุณหภูมิ พีเอช โซเดียมคลอไรด์ วอเตอร์แอกทิวิตี แร่ธาตุและสารประกอบอาหาร โดยที่การผลิตเอนเทอโรทอกซินมีลักษณะการผลิต แบ่งได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ SEB และ SECs กลุ่มนี้จะผลิตในปริมาณสูง และขึ้นอยู่กับสภาวะในการบ่มเลี้ยงเชื้อ กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของ SEA SED และ SEE ซึ่งจะผลิตได้ในปริมาณที่น้อยกว่า และการผลิตจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเจริญของสายพันธุ์มากกว่าสภาวะในการบ่ม (Smith et al., 1983 cited in Bergdoll, 1989)

โดยทั่วไปการผลิตเอนเทอโรทอกซินขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ พีเอช อุณหภูมิ วอเตอร์แอกทิวิตี อาหารเลี้ยงเชื้อและอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตาม *Staphylococcus* ก็สามารถผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ทั้งในอาหารที่อุดมสมบูรณ์และสภาวะขาดแคลนอาหาร

9.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ในเริ่มแรกมีการรายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* นั้นรบกวนต่อการตรวจวัดเอนเทอโรทอกซิน จึงได้มีการพัฒนาสูตรอาหารอื่นที่เหมาะสมโดยพบว่า อาหารที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* นั้นควรเติมเคซีนไฮโดรไลเสต (Casein Hydrolysate) และจำเป็นต้องเติมกรดอะมิโนซีสเตอีน (Cystein) และทริปโตแฟน (Tryptophan) และมีไนเอซิน (Niacin) กับไทเอมีน (Thiamine) เป็นซับพลีเมนต์ (Subplement) ซึ่งพบว่าอาหารสูตรนี้เหมาะกับการผลิต SEB จากนั้นมีการพัฒนาต่อไป

โดยการเพิ่มโปรตีนไฮโดรไลเสตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นของไฮโดรไลซ์เคซีน (Hydrolyzed Casein) มีผลต่อปริมาณการผลิต SEB และการเพิ่มความเข้มข้นจากร้อยละ 2 เป็นร้อยละ 6 จะเพิ่มการผลิต SEB จาก 200 เป็น 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kato, Khan, Kyjovich, & Bergdoll, 1966 cited in Bergdoll, 1989) สูตรอาหารดังกล่าวถูกนำไปใช้ในสถาบันวิจัยอาหารเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนเทอโรทอกซินเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นก็มีการพัฒนาอีกโดยใช้ยีสต์สกัด (Yeast Extract) ร้อยละ 1 แทนโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งเป็นที่ยอมรับในเวลาต่อมา นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การเติมทริปติเคส (Trypticase) ร้อยละ 4 และยีสต์สกัดร้อยละ 1 สามารถกระตุ้นการผลิต SEB แต่อย่างไรก็ตามชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีนก็เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดอาจถูกทำลายลงไปจนทำให้เกิดภาวะขาดแคลน เช่น ซีสเตอีนที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus*

มีการทดลองพบว่า การเติมกลูโคสในอาหารส่งผลให้หยุดยั้งการผลิตเอนเทอโรทอกซินได้เพราะกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้พีเอชลดลง แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่า การเติมกลูโคสร้อยละ 0.2 ในระหว่างการเจริญของ *S. aureus* ทำให้การผลิต SEB เพิ่มได้ถึง 580 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ 255 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อไม่มีกลูโคส (Metzger, Johnson, Collins, & McGann, 1973 cited in Bergdoll, 1989) สำหรับไนเอซินและไทเอมีนนั้นจำเป็นสำหรับการเจริญของ *Staphylococcus* แต่การเติมยีสต์สกัดเป็นการจำกัดวิตามิน 2 ชนิดนี้ ดังนั้นในปัจจุบันอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับติดตามการผลิตเอนเทอโรทอกซินนั้นควรมีโปรตีนไฮโดรไลเสตผสมกับยีสต์สกัด

9.2 อุณหภูมิ

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Staphylococcus* คือ 35-37 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้ดีคือ 10-45 องศาเซลเซียส และมีเพียงไม่กี่สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำมากหรือสูงมาก อุณหภูมิที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ดี คือ 37 องศาเซลเซียส แม้ว่า *S. aureus* จะผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่ก็ได้ปริมาณน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส และพบว่าการผลิต SEB ที่อุณหภูมิ 16 และ 20 องศาเซลเซียส ได้เอนเทอโรทอกซินเพียง 10-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ขณะที่ 37 องศาเซลเซียสผลิตได้ถึง 340 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบการผลิต SEB 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว Brain Hearth Infusion หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มนาน 8 วัน พบว่าปริมาณลดลงเป็น 25, 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มที่ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และไม่พบเอนเทอโรทอกซินถ้าบ่มนาน 8 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ผลิต SEA, SEB, SEC และ SED ที่เลี้ยงใน BHI สามารถผลิตได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 19-39 องศาเซลเซียส แต่มีเพียง SEB เท่านั้นที่ถูกผลิตได้ที่อุณหภูมิ 45 และ 13 องศาเซลเซียส เอนเทอโรทอกซินทั้งหมดเกิดขึ้นเหมือนกันเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไฮโดรไลซ์เคซีน บ่มที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 ชั่วโมง และพบการเจริญน้อยกว่าร้อยละ 50 เมื่อเลี้ยงที่ 20 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิต SEB จะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส โดยผลิตได้น้อยกว่าร้อยละ 50 ถ้าบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส น้อยกว่าร้อยละ 60 เมื่อเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส และน้อยกว่าร้อยละ 99 ถ้าเลี้ยงที่ 20 องศาเซลเซียส และไม่พบการผลิตถ้าเลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส ในทางตรงกันข้ามมีการรายงานว่าการผลิต SEB และ SEC สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงที่ 40 องศาเซลเซียส และผลิตได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส และไม่พบเมื่อเลี้ยงที่ 10 และ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า SEA และ SEB ผลิตได้ปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิ 39.4 องศาเซลเซียส และลดลงที่ 45 องศาเซลเซียส (Dietrich, Watson, & Silverman, 1972; Genigeogis & Sadler, 1966 cited in Bergdoll, 1989)

9.3 พีเอช

Staphylococcus ส่วนใหญ่เจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4.5-9.3 และมีพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 การที่พีเอชจะส่งผลต่อการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของเกลือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และบรรยากาศ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองส่วนใหญ่ไม่ได้ควบคุมพีเอช เนื่องจากข้อจำกัดด้วยวิธีควบคุม เคยมีการศึกษาโดยพยายามควบคุมพีเอชด้วยการใช้โซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ ปรากฏว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ใช้ในการควบคุมมีผลยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* ดังนั้นจึงทำให้เกิดข้อจำกัดในการศึกษา จากการศึกษาพบว่าพีเอชที่เหมาะสมของการผลิต SEB คือ 7.5 และการผลิตจะลดลงที่พีเอช 6.0 และ 8.0 เนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของสารที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบว่า การที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง อาจเนื่องมาจากการมีกลูโคสในอาหาร ซึ่งจะทำให้พีเอชต่ำลงเมื่อมีการเจริญของ *Staphylococcus* ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินบางชนิด แต่ไม่มีผลต่อการผลิต SEB และ SEC สำหรับโอกาสที่พีเอชจะเพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลมาจากกรดอะมิโนเกิดเป็นแอมโมเนีย และเมื่อปรับพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 5.0-8.0 (เพิ่มขึ้นครั้งละ 0.5) พบว่า เอนเทอโรทอกซิน ผลิตสูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 และ 6.5

การผลิตเอนเทอโรทอกซินในอาหารขึ้นอยู่กับพีเอชของอาหารซึ่งช่วงพีเอชในการผลิตเอนเทอโรทอกซินจะจำกัดมากกว่าช่วงพีเอชในการเจริญ การผลิต SEA, SEB, SEC และ SED จะเกิดขึ้นได้ในช่วงพีเอช 5.5-6.6 แต่จะไม่ผลิตถ้าพีเอชต่ำกว่า 5.0 (Bergdoll, 1989)

9.4 วอเตอร์แอกทิวิตี

วอเตอร์แอกทิวิตีเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญสำหรับการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus* โดยเชื้อสามารถเจริญได้ในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตีที่กว้างมากกว่าแบคทีเรีย

ชนิดอื่น ซึ่งการเจริญสามารถเกิดขึ้นได้ที่วอเตอร์แอกทิวิตี 0.83 และมีวอเตอร์แอกทิวิตีที่เหมาะสมที่ 0.99 สำหรับการเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจนนั้นวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.90 และการผลิตเอนเทอโรทอกซินก็เกิดขึ้นได้น้อย

การใช้ฮิวเมคแตนท์สำหรับปรับค่าวอเตอร์แอกทิวิตีนั้น มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus* พบว่าการเจริญของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต SEB ที่วอเตอร์แอกทิวิตีต่ำ ที่ปรับด้วยโซเดียมคลอไรด์ โพแตสเซียมคลอไรด์และโซเดียมซัลเฟต จะน้อยกว่าเมื่อปรับค่าวอเตอร์แอกทิวิตีด้วยโซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว มีการศึกษาใช้กลีเซอรอลเป็นฮิวเมคแตนท์ปรับวอเตอร์แอกทิวิตีที่ 0.90 พบว่า การเจริญเกิดขึ้นได้ แต่การผลิต SEB ไม่เกิดขึ้น และเมื่อทดลองเติมโซเดียมคลอไรด์แทนกลีเซอรอล พบว่ามีการผลิต SEB ได้ที่วอเตอร์แอกทิวิตี 0.91 และมีการทดลองพบว่า *S. aureus* สายพันธุ์ FRI-196E เจริญได้เท่ากันในฮิวเมคแตนท์ทั้งสองชนิด แต่การผลิต SEA เกิดขึ้นได้ดีกว่า เมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์แทนกลีเซอรอล มีรายงานที่เกี่ยวกับผลของการใช้โซเดียมคลอไรด์และโปแตสเซียมคลอไรด์ผสมกับกลีเซอรอลต่อการเจริญและผลิต SEA ของ *S. aureus* 2 สายพันธุ์ (FRI-100 และ M711) พบว่าการเจริญและการผลิต SEA เกิดขึ้นได้ที่วอเตอร์แอกทิวิตี 0.864 และ 0.867 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และผลิต SEA ได้สูงที่สุดเมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นกล่าวได้ว่าค่าวอเตอร์แอกทิวิตีมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินได้จะขึ้นอยู่กับพีเอชและอุณหภูมิในการบ่ม (Troller, 1972; Lotter & Leistner, 1978 cited in Bergdoll, 1989)

9.5 บรรยากาศ

Staphylococcus สามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับในสภาวะมีออกซิเจน แต่อัตราการเจริญต่ำกว่า สำหรับการผลิตเอนเทอโรทอกซินนั้น มีการรายงานว่า เชื้อมีการผลิต SEB ได้ในเนื้อรมควัน ที่เก็บที่อุณหภูมิ 22 และ 30 องศาเซลเซียส

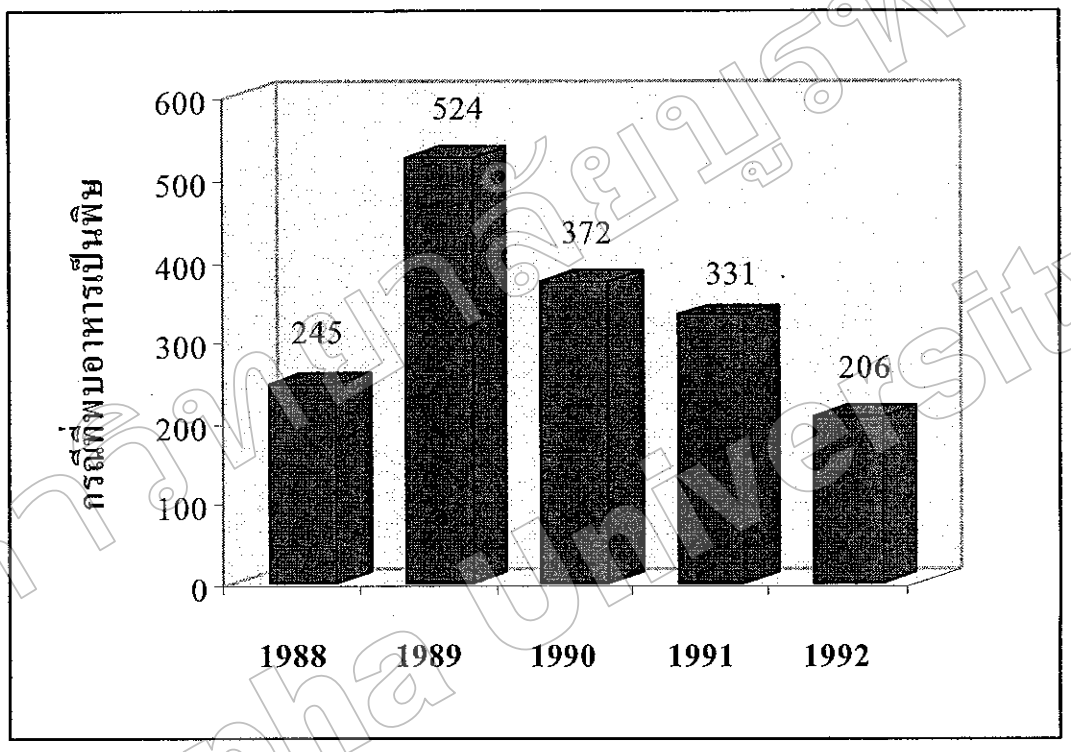
การเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินในอาหารพบว่าขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพ อณหภูมิ พีเอช ความชื้น บรรยากาศและเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา นอกจากนั้นปริมาณเซลล์เริ่มต้น ชนิดของเอนเทอโรทอกซินก็มีความสำคัญในการพิจารณาร่วมด้วย

10. การระบาด

การเกิดอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเอนเทอโรทอกซินและสภาวะของอาหารก็เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการพบเอนเทอโรทอกซินในอาหารนั้น ซึ่งอาหารที่พบต้องมีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Staphylococcus* และผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ในอาหารนั้น (Lopes, Noleto, Las-Heras & Bergdoll, 1993)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มีการรายงานเกี่ยวกับการระบาดของ *S. aureus* ที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษจำนวนมาก และผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่ได้พบแพทย์ ในเดือนกันยายน ปี 1997 ในสหรัฐอเมริกาพบการระบาดของอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* ในปี ค.ศ. 1989 ถึง ค.ศ. 1992 มีจำนวนทั้งสิ้น 1,678 ราย (ภาพที่ 2) โดยพบประชาชนมีอาการป่วยหลังจากรับประทานอาหารกลางวัน



ภาพที่ 3 จำนวนผู้ป่วยอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *Staphylococcus* (Labbe & Garcia, 2001)

ซึ่งแสดงอาการคลื่นเหียนและอาเจียน ท้องร่วง น้ำหนักลด และมีอาการสะท้าน โดยอาการเหล่านี้จะแสดงออกระหว่าง 1-7 ชั่วโมง หลังจากติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการระบาดของอาการอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจาก *S. aureus* ในสถาบันอื่น ๆ เช่น โรงเรียน โรงพยาบาล ที่เก็บรักษาอาหารที่ช่วงอุณหภูมิอันตราย (Temperature Danger Zone) ดังนั้นการเก็บอาหารให้พ้นช่วงดังกล่าว คืออุณหภูมิ 6-60 องศาเซลเซียส และมีการนำอาหารมาประกอบอย่างรวดเร็ว จะเป็นวิธีป้องกันที่ดีวิธีหนึ่ง นอกจากนี้การล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่หลังจากเข้าห้องน้ำ หรือก่อนการประกอบอาหารก็สามารถช่วยป้องกันได้เช่นกัน (Bennet & Lancettle, 1998)

จากรายงานการวิจัยของ Soriano, Font, Rico, Molto, and Manes (2002) ศึกษาการระบาดของ *Staphylococcus* ที่ผลิตสารพิษในอาหาร จากตัวอย่าง 504 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ศูนย์อาหารและร้านอาหารในระยะสุดท้ายของการเตรียม โดยตัวอย่างที่มาจากร้านอาหาร พบ *Staphylococcus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินร้อยละ 3.8 ของตัวอย่างจากร้านอาหารโดย *Staphylococcus* ร้อยละ 52.6 ผลิต SEC และร้อยละ 21.1, 15.8 และ 10.5 ผลิต SED, SEB และ SEA ตามลำดับ

อาการอาหารเป็นพิษมีผลกระทบสำคัญต่อสุขภาพชุมชน มีการประมาณว่าในแต่ละปีของสหรัฐอเมริกามีผู้ป่วยจากอาหารเป็นพิษ 6-80 ล้านคน และในจำนวนนี้เสียชีวิตมากกว่า 9,000 ราย ซึ่งสาเหตุนี้ทำให้สหรัฐอเมริกาต้องสูญเสียงบประมาณถึง 5 พันล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา สำหรับผู้ที่บริโภคอาหารที่มีการผลิตเอนเทอโรทอกซินโดย *Staphylococcus* นั้นจะทำให้เกิดการอาเจียน เป็นอาการแรกและตามด้วยท้องร่วง และจากการรายงานพบว่า SEA เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของอาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริกา รองลงมาคือ SED และ SEB โดยพบในผู้สูงอายุมากกว่าวัยรุ่น และอาการอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* นั้นเกิดจากการได้รับสารพิษในปริมาณที่น้อยมาก (Balaban & Rasooly, 2000)

10.1 อาหารที่เกี่ยวกับการระบาด

การระบาดอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* เป็นผลมาจากบริโภคอาหารที่มีการผลิตเอนเทอโรทอกซินหลังจากที่อาหารนั้นปรุงเสร็จหรือให้ความร้อนแล้ว แต่อย่างไรก็ตามการระบาดในบางครั้งก็เกิดขึ้นได้หลังจากการบริโภคอาหารที่ให้ความร้อนเหมาะสมแล้ว แต่เนื่องจากมีการผลิตเอนเทอโรทอกซินก่อนการให้ความร้อน แต่เอนเทอโรทอกซินไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนและคงสภาพอยู่ ส่งผลให้เกิดการระบาด อาหารที่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับการเจริญของ *Staphylococcus* มีอยู่หลายชนิด เช่น นม ครีม คัสตาร์ด เนื้อ ผลิตภัณฑ์เนื้อแฮม

Adwan, Abu-Shanab, and Adwan (2005) สำรวจ *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินในน้ำนมดิบในตอนเหนือของประเทศปาเลสไตน์ โดยเก็บตัวอย่างจากนมแกะ 120 ตัวอย่าง และนมวัว 130 ตัวอย่าง โดยเป็นสัตว์ที่มีสุขภาพดี ไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ ทำการแยก *S. aureus* และทดสอบการผลิตสารพิษโดยการตรวจหายีนที่ผลิตด้วยวิธี PCR ซึ่งหายีนของ SEA-SEE จากการศึกษาพบยีนที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินใน *S. aureus* ร้อยละ 37 และเมื่อหาชนิดของสารพิษจาก *S. aureus* ที่ผลิตสารพิษทั้งหมด พบว่าเป็น SEA ร้อยละ 10.8 SEB ร้อยละ 54.1 SEC ร้อยละ 10.8 SED ร้อยละ 16.2 และ SEE ร้อยละ 8.1 และไม่พบไอโซเลทที่สามารถผลิตสารพิษได้มากกว่า 1 ชนิด

Aragon-Alego et al. (2006) ศึกษาการแพร่กระจายของ *S. aureus* ที่ให้ผลโคแอกกูเลสบวกในอาหารหลายชนิดจากเมือง Botucatu ประเทศบราซิลและตรวจสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินในอาหารและจากสายพันธุ์ที่แยกได้ เพื่อติดตามคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของนม ชีสนุ่ม ชีสก้อน และไอศกรีม พบ *Staphylococcus* ทั้งหมดร้อยละ 15.1 ของตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อทดสอบ

การผลิตสารพิษจาก *S. aureus* ที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ร้อยละ 54 แต่ตรวจสอบ ไม่พบเอนเทอโรทอกซินในอาหาร และพบว่าเป็น *S. aureus* ที่ผลิต SEC มากที่สุด

10.2 แหล่งของการปนเปื้อน

Staphylococcus พบได้ทุกที่และมีแหล่งที่พบเป็นหลัก คือ มนุษย์และสัตว์ สำหรับในผู้ที่สุขภาพดีนั้น พบว่า มีโอกาสเป็นพาหะร้อยละ 30-50 ในขณะที่ผู้ที่รักษาตัวในโรงพยาบาลมีโอกาสเป็นพาหะสูงกว่าคืออยู่ในช่วงร้อยละ 60 การไอหรือจามของผู้ที่ประกอบอาหารเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อน *Staphylococcus* ในอาหาร เพราะเป็นพาหะให้ *Staphylococcus* ในลำคอหรือจมูกออกสู่อาหารได้

Carmo et al. (2002) ติดตามการระบาดในปี ค.ศ. 1999 ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึงพฤษภาคม ในประเทศบราซิล พบว่า สาเหตุของการระบาดในผู้ป่วยจากอาหารเป็นพิษโดย *Staphylococcus* เกิดจาก 2 สาเหตุ สาเหตุแรกพบว่า 50 คน มีอาการหลังจากการรับประทานชีสโดยมีอาการของโรค คือ ท้องร่วง อาเจียน หน้ามืด สะท้าน และปวดศีรษะ ซึ่งปรากฏหลังจากผ่านไป 2 ชั่วโมง หลังจากการบริโภคชีส สาเหตุการระบาดที่สอง พบใน 328 คน ซึ่งมีอาการท้องร่วง อาเจียน หลังจากดื่มน้ำนมดิบ จึงมีการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างชีสและน้ำนมดิบมาวิเคราะห์หา *S. aureus* และการผลิตเอนเทอโรทอกซินพบว่าในตัวอย่างชีสพบ *S. aureus* $2.4x10^3$ ถึง $2.0x10^8$ เซลล์ต่อกรัม และพบว่า *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นลบ ซึ่งผลิต SEC และ SED ดังนั้นในการระบาดของทั้งสองกรณีจึงขึ้นอยู่กับแหล่งของการปนเปื้อน คือ ในกรณีแรกนั้นเกิดการปนเปื้อนของมือผู้ประกอบการ ส่วนการระบาดในกรณีที่สองเกิดจากการเป็นโรคเต้านมอักเสบของสัตว์

11. ลักษณะทางชีววิทยาที่ทำให้เกิดโรค (Bergdoll, 1989)

อาการป่วยที่เกิดจากอาหารเป็นพิษโดย *Staphylococcus* เกิดเมื่อมีการบริโภคอาหารที่มีเอนเทอโรทอกซินเข้าสู่ร่างกายแม้ในปริมาณน้อยก็ตาม อาการหลักของโรค เช่น อาเจียน ท้องร่วง อย่างไรก็ตามการตายก็เกิดขึ้นได้ เมื่อได้รับเอนเทอโรทอกซินในปริมาณที่สูง

11.1 การอาเจียน

การอาเจียน เป็นอาการที่พบได้บ่อยเมื่อเกิดอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* ซึ่งปฏิกิริยานี้มีการนำลิงมาเป็นสัตว์ทดลองเนื่องจากมีการตอบสนองได้ใกล้เคียงกับมนุษย์มากกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่น ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาเอนเทอโรทอกซินจนทำให้เกิดการอาเจียน คือ บริเวณช่องท้องของลิง การกระตุ้นให้เกิดการอาเจียนจะเป็นการกระตุ้นสมองส่วนควบคุมการอาเจียน

11.2 อาการท้องร่วง

อาการท้องร่วงเป็นอาการที่สองรองจากการอาเจียน ซึ่งในการระบาดที่มีจำนวนประชากรมากนั้น พบว่าแต่ละบุคคลจะพัฒนาอาการท้องร่วงมาจากการอาเจียน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

11.3 ลำไส้อักเสบ

อาการนี้เป็นอีกอาการหนึ่งที่เกิดขึ้นได้เมื่อได้รับพิษโดยการบริโภค แต่เกิดขึ้นได้ไม่บ่อยนักยกเว้นกรณีพิเศษ เช่น กรณีผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดแล้วให้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) เมื่อมีการรับ *Staphylococcus* เข้าสู่ร่างกาย พบว่า *Staphylococcus* สามารถเจริญได้ที่บริเวณลำไส้ เนื่องจากแบคทีเรียประจำถิ่นถูกทำลายลงจากผลของยาปฏิชีวนะ

11.4 เป็นไข้

อาการไข้ไม่พบได้บ่อยนักในอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* แต่มีการทดลองพบว่า การรับ SEA และ SEB (0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) เข้าสู่ร่างกายแมวก็ส่งผลให้อุณหภูมิสูงขึ้นถึง 2.7 องศาเซลเซียส

12. การตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหาร (Su & Wong, 1997)

มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินหลากหลายวิธี ทั้งทางด้านอิมมิวโน (Immunological Assay) และชีวภาพ (Biological Assay) โดยทางด้านอิมมิวโนนั้น มีความไวและจำเพาะมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการเกิดความเป็นพิษนั้นขึ้นอยู่กับความไวในการตอบสนองของผู้ที่ได้รับเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเคยพบการระบาดที่เกิดจากเอนเทอโรทอกซินที่มีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 0.5-0.75 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นวิธีที่สามารถตรวจวัดได้นั้นต้องเป็นวิธีตรวจวัดที่ไวต่อเอนเทอโรทอกซินที่มีปริมาณน้อยกว่า 0.5 นาโนกรัมต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของอาหาร

12.1 การวิเคราะห์ทางชีวภาพ

จากเดิมเอนเทอโรทอกซินทุกชนิดตรวจวัดจากกิจกรรมการเกิดโรคเมื่อลิง (สัตว์ทดลอง) บริโภคอาหารเข้าไป โดยตัวอย่างจะมีผลต่อระบบทางเดินอาหารของลิง ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 5 ชั่วโมง หลังจากรับเข้าสู่ร่างกาย การเกิดโรคจะเป็นสิ่งบ่งชี้ว่ามีเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่าง ซึ่งอาจมีหนึ่งชนิดหรือมากกว่า วิธีนี้ไม่ไวต่อการตอบสนอง ต้องการปริมาณในการเกิดโรคช่วงกว้างคือ 5-20 ไมโครกรัม เนื่องจากการตอบสนองของลิงมีความแตกต่างกัน และการตรวจวัดด้วยวิธีนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิดได้ นอกจากการทดลองในลิงแล้ว ยังมีการทดลองในแมว โดยฉีดเอนเทอโรทอกซินเข้าในเส้นเลือดดำ พบว่าปฏิกิริยานั้นไม่จำเพาะ หรือจะเป็นในสุกรโดยการฉีดเอนเทอโรทอกซินที่ติดสีเข้าสู่ผิวหนังชั้นในของสุกร พบว่าเกิดปฏิกิริยากับผิวหนังของสุกรโดยตรวจวัดได้เป็น SEB ซึ่งต้องใช้ปริมาณ 10 พิโคกรัม ในเวลา 10-15 นาที อย่างไรก็ตามสามารถตรวจวัดได้เฉพาะ SEB เท่านั้น

12.2 การวิเคราะห์ทางอิมมิวโน

เป็นการจำแนกชนิดเอนเทอโรทอกซินโดยอาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีกับเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิด ขณะที่เอนเทอโรทอกซินที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันจะมีกิจกรรม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ทางชีวภาพเหมือนกัน จึงแยกออกจากกันไม่ได้ ซึ่งความแตกต่างสามารถแยกได้ด้วยข้อมูลทางอิมมิวโน

12.2.1 Double Gel Immunodiffusion

อาศัยหลักการตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินจากระบบน้ำเหลือง (Serological Assay) ซึ่งเอนเทอโรทอกซินทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่กระจายไปในแผ่นเจลแต่ละแผ่น และเกิดการตกตะกอนลักษณะเป็นแถบ ตำแหน่งที่ตกตะกอนจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นและอัตราการแพร่ของสาร 2 ชนิดที่ทำปฏิกิริยากัน วิธีนี้รวมถึงไมโครสไลด์ (Microslide) ออพติมัลเซนซิติวิตี้เพลต (Optimal Sensitivity Plate [OSP]) และซิงเกิ้ลเรเดียลอิมมิวโนดิฟฟิวชั่น (Single Radial Immunodiffusion [SRD]) ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นวิธีกึ่งปริมาณ ซึ่งจะไวต่อเอนเทอโรทอกซินประมาณ 0.1-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

12.2.1.1 Microslide Technique

เป็นวิธีแรกที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินในอาหาร ซึ่งจะไวต่อเอนเทอโรทอกซินประมาณ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวอย่างสำหรับตรวจวัดในปริมาณที่น้อยมาก (ประมาณ 20 ไมโครลิตร) องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (U.S. Food & Drug Asministration) ให้การยอมรับว่าเป็นวิธีที่ได้มาตรฐาน ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้กับทั้งตัวอย่างสกัดตัวอย่างเข้มข้น หรือเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อสงสัย กล่าวคือความไวต่อเอนเทอโรทอกซินต่ำกว่า 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเคยมีการทดลองเติมแอนเทอโรทอกซินลงในตัวอย่างปริมาณ 100-200 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหาร พบว่าตรวจพบเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่างจำนวน 189 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง 260 ตัวอย่าง คิดเป็นความแม่นยำเพียงร้อยละ 72.7 เท่านั้น ส่วนข้อเสียอื่น ๆ เช่น ใช้เวลาในการทดสอบนาน คือ ถึง 3 วันจึงจะได้ผลที่สมบูรณ์ เพราะการตกตะกอนต้องใช้เวลาถึง 72 ชั่วโมง เมื่อมีการบ่มที่อุณหภูมิห้อง หรือถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมง และการอ่านผลที่สังเกตการณ์ติดสีทำได้ยากในกรณีที่มีเอนเทอโรทอกซินน้อยมาก ๆ

12.1.1.2 Optimal Sensitivity Plate (OSP)

วิธี OSP ถูกพัฒนาขึ้นมาเริ่มแรกเมื่อใช้ในการคัดแยก *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน โดยอาศัยการเกิดแถบของตะกอน วิธีนี้จะตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินได้ในปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง ข้อดีของวิธีนี้ก็คือเตรียมตัวอย่างได้ง่าย เกิดการตกตะกอนได้ภายใน 24-30 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องและจะเร็วมากขึ้นถ้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (18 ชั่วโมง) การเกิดแถบจะสังเกตเห็นง่ายขึ้นถ้าแช่เพลต (Plate) ในกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณตัวอย่างที่ใช้จะเท่ากับวิธีไมโครสไลด์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ความไวของ

วิธีนี้จะเทียบไม่ได้กับวิธีไมโครสไลด์ แต่วิธีนี้ก็ง่ายในการตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินและเหมาะสำหรับการตรวจหาเริ่มแรก

12.2.1.3 Single Radial Immunodiffusion (SRD)

วิธี SRD ถูกดัดแปลงมาจากเทคนิคไมโครสไลด์ โดยเป็นการเจือจางแอนติซีรั่มเติมลงในวุ้นหลอมเหลว และผสมให้กระจายทั่วสไลด์ ข้อดีของวิธีนี้สามารถทดสอบตัวอย่างได้มากกว่า 10 ตัวอย่างในสไลด์แผ่นเดียว โดยปริมาณที่วัดได้ คือ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไวกว่าวิธี OSP แต่ก็ต้องการแอนติซีรั่มมาใช้ในการทดสอบซึ่งยุ่งยากมากกว่า

12.2.2 Radioimmunoassay (RIA)

เป็นวิธีแรกที่พัฒนาขึ้นแล้วมีความไวต่อเอนเทอโรทอกซินในระดับที่น้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์นี้อาศัยการแข่งขันกันจับกับตำแหน่งจำเพาะบนโมเลกุลของแอนติบอดีระหว่างสีที่ติดฉลาก (Radiolabelled) กับแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากของตัวอย่าง ซึ่งแอนติบอดีจะจับอยู่บนโซลิดเฟส (Solid-Phase) ของ RIA อย่างจำเพาะ และเคลือบโซลิดเฟสด้วยโบไวน์ซีรั่มแอลบูมิน (Bovine Serum Albumin) หรือเจลาติน (Gelatin) ก่อนที่จะมีการเติมตัวอย่างลงในระบบ RIA เนื่องจากอนุภาคอื่นที่ไม่มีความจำเพาะกับโซลิดเฟสทั้งที่ติดฉลากและแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากจะจับกับโซลิดเฟสไม่ได้ สามารถตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินได้ในตัวอย่างอาหารที่ไม่ต้องมีความเข้มข้นเอนเทอโรทอกซินสูง ไม่ต้องเกิดปฏิกิริยาแบบจำเพาะ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องการเอนเทอโรทอกซินที่มีความบริสุทธิ์และต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางในการตรวจวัด

12.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA เป็นวิธีแรกที่ค้นพบขึ้นสำหรับตรวจวัด SEA ซึ่งในปัจจุบันถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากให้ผลได้รวดเร็วและมีความชัดเจนในการตรวจวัด ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความไว (สูงกว่าวิธี RIA) ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และแม้ว่าเอนไซม์และแอนติบอดีจะจับกันแล้วก็สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานโดยที่กิจกรรมไม่หายไป

ในกรณีที่เป็น ELISA แบบแย่งจับ จะเป็นการแย่งกันจับกับแอนติบอดีระหว่างเอนเทอโรทอกซินที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์และเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่าง การจับกันของเอนไซม์ที่ติดด้วยเอนเทอโรทอกซินกับแอนติบอดีนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่าง ถ้าในตัวอย่างมีเอนเทอโรทอกซินในปริมาณที่สูงการจับของเอนเทอโรทอกซินที่ติดด้วยเอนไซม์ก็จะจับได้ในปริมาณน้อย การอ่านผลเพื่อบอกปริมาณของเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่างนั้น จะสังเกตจากการเกิดสีหลังจากที่มีการเติมสับสเตรต (Substrate) ของเอนไซม์ลงไป หลักการนี้จะคล้ายคลึงกับวิธี RIA และต้องการเอนเทอโรทอกซินบริสุทธิ์ปริมาณมากในการวิเคราะห์ สำหรับกรณีที่เป็น ELISA

แบบไม่แย่งจับจะเป็นการใช้แบบดับเบิ้ลแอนติบอดีแซนวิช (Double-Antibody Sandwich ELISA) โดยแอนติบอดีที่จำเพาะจะถูกดูดซับอยู่บนโซลิดเฟสซึ่งจะเพิ่มการดูดซับของแอนติบอดีให้ยึดติดกับโซลิดเฟสได้โดยการเคลือบด้วยโบไวน์ซีรั่มแอลบูมินร้อยละ 1 หรือบัฟเฟอร์ที่ผสมทวีน 20 (Tween 20) ร้อยละ 0.5 เอนเทอโรทอกซินในตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดีที่ติดอยู่บนโซลิดเฟส จากนั้นตรวจได้ด้วยการเติมเอนไซม์ที่ติดด้วยแอนติบอดี ทำให้เกิดเป็นเอนเทอโรทอกซิน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธี ELISA แบบแย่งจับ ต้องการเอนเทอโรทอกซินในปริมาณที่น้อยสำหรับการวิเคราะห์ ใช้เวลาน้อย และกรณีที่ใช้เวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง สามารถตรวจวัด SEA ได้ตั้งแต่ 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป

12.2.4 Nucleic Acid-Based Detection Methods

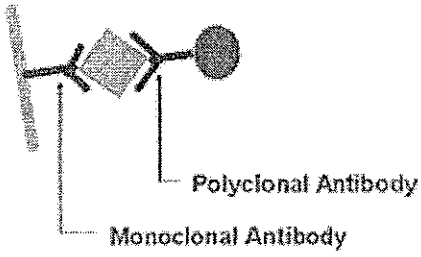
วิธีนี้พัฒนาขึ้นจากเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA Technology) ซึ่งเป็นวิธีใหม่สำหรับตรวจวัดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร คือ เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีนที่ทำให้เกิดโรค จะสังเคราะห์โพรบ (Probe) ขึ้นมาสำหรับตรวจวัดจุลินทรีย์นั้น โดยอาศัยเทคนิค PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อยสำหรับการวิเคราะห์ ใช้เวลาน้อย อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR ก็ไม่สามารถจำแนกได้ระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตาย เนื่องจาก DNA จากเซลล์ที่ตายแล้วก็สามารถเพิ่มจำนวน (Amplify) ด้วยเทคนิคนี้ได้ ในขณะที่เทคนิค PCR สามารถตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินและให้ผลเป็นบวกนั้น สามารถบ่งชี้ได้ว่ามีเซลล์อยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่ได้หมายความว่ามีเอนเทอโรทอกซินในตัวอย่าง เนื่องจากการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหารต้องมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ประกอบด้วยหลายปัจจัย คือ พีเอช อุณหภูมิ วอเตอร์แอกทิวิตี องค์ประกอบของอาหาร แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็สามารถบ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างอาหารนั้นมีการปนเปื้อนมากน้อยเพียงใด (Su & Wong, 1997)

12.3 Diagnostic Kits

12.3.1 mini-VIDAS

Mini-VIDAS เป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารอัตโนมัติด้วยวิธี ELFA (Enzyme Linked Fluorescence Assay) โดยอาศัยหลักการทาง ELISA แบบแซนวิช (ภาพที่ 4) นั้นคือทำการเคลือบโซลิดเฟส (Solid Phase Receptacle [SPR]) ด้วยแอนติบอดี จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างที่ต้องการตรวจและแอนติบอดีที่ติดด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase) ให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับฟลูโอเรสเซนต์สับสเตรต (Fluorescent Substrate) คือ 4-Methyl Umbelliferyl Phosphate (4-MUP) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 4-Methyl Umbelliferone ซึ่งเป็นสารฟลูโอเรสเซนต์ (Fluorescent) สามารถตรวจวัดได้ด้วยหัวอ่านคลื่นแสง (Optical Scanner) ที่ความยาวคลื่น 370 และ 450 นาโนเมตร (Meyrand et al., 1998)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4 แอนติบอดีที่ติดด้วยเอนไซม์จับอย่างจำเพาะกับแอนติเจน (Biomerieux Industry, 2006)

12.3.2 Staphylococcal Enterotoxin-Reverse Passive Latex Agglutination (SET-RPLA)

หลักการของวิธีนี้ คือ อนุภาคของ Polystyrene Latex ที่เชื่อมต่ออยู่กับแอนติซีรั่ม (Antiserum) สำหรับเอนเทอโรทอกซินแต่ละชนิด (SEA, SEB, SEC และ SED) และในชุดควบคุมจะเป็นการเชื่อมต่ออยู่กับ Non-Immuno Rabbit Globulin โดยปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อแอนติซีรั่มเกิดโครงสร้างตาข่ายกับเอนเทอโรทอกซินทำให้ตกตะกอน (Soriano et al., 2002) ชุดทดสอบสำเร็จรูปนี้จะจำกัดความไวต่อปริมาณเอนเทอโรทอกซินชนิด A, B, C และ D ที่ความเข้มข้น 0.12, 0.07, 0.17 และ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (Delbes, Alomar, Chougui, Martin, & Montel, 2006)

สำหรับชุดทดสอบสำเร็จรูปนอกจาก 2 ชนิดที่กล่าวมาที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ยังพบว่ามีอีกหลายรายการที่นำมาใช้ในการทดสอบ ดังตารางที่ 5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 5 ตัวอย่างชุดทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *Stahpylococcus* สำเร็จรูป (Labbe & Garcia, 2001)

ชื่อชุดทดสอบ	รูปแบบการวิเคราะห์	บริษัท
TECRA-SET	ELISA, Polyvalent[a] (A-E)	TECRADiagnostics, Roseville, NSW, Australia
TECRA-SET	ELISA, Monovalent[b] (A-E)	TECRADiagnostics, Roseville, NSW, Australia
SET-RPLA	Latex Agglutination, Monovalent (A-D)	Unipath-Oxoid Division, Ogdensburg, NY
VIDAS-SET	ELFA, Polyvalent (A-E)	BioMerieux-Vitex, Hazelwood, MO
Transia Tube-SET	ELISA, Polyvalent (A-E)	TRANSIA Diffchamb, SA, Lyon, France
Transia Plate-SET	ELISA, Polyvalent (A-E)	TRANSIA Diffchamb, SA, Lyon, France
SET-EIA	ELISA, Polystyrene Ball, Monovalent (A-D)	Diagnostische Laboratorien, Bern, Switzerland
Microtiter Plate-SET	ELISA, Polyvalent (A-E)	W. Brommeli, Bern, Switzerland
Ridascreen SET	ELISA, Monovalent (A-E)	R. Biopharm GmbH, Darnstadt, Germany

[a] ไม่มีความแตกต่างระหว่างซีโรไทป์ของทอกซิน

[b] มีความแตกต่างระหว่างซีโรไทป์ของทอกซิน

13. การปนเปื้อนและการควบคุม

การเกิดโรคจากอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* นั้นพบได้บ่อย อาหารกลุ่มที่มีการปนเปื้อนด้วย *S. aureus* ที่สำคัญได้แก่ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่มีไส้ครีม สลัด อาหารทะเล สาเหตุใหญ่ของการเกิดอาหารเป็นพิษ เกิดจากอาหารที่ผ่านการผลิตแล้วถูกปนเปื้อนด้วย *S. aureus* จากมนุษย์ เมื่อเก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลายชั่วโมง ทำให้เชื้อนี้สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ในอาหาร ตัวอย่างของอาหารเหล่านี้ได้แก่ อาหารที่มีการจัดเตรียมไว้ล่วงหน้าเป็นเวลานานก่อนการบริโภค อาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* มักเกิดขึ้นกับอาหารที่มีการแปรรูป ซึ่งมักมีการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตหรืออุปกรณ์ที่ใช้ระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นดัชนีบอกถึงสุขอนามัยของเครื่องมือ โดยเกิดจากการสัมผัสของมนุษย์หรืออาหารสัมผัสกับพื้นที่มีจุลินทรีย์ ดังนั้นในระหว่างกระบวนการผลิตอาหารจึงควรปฏิบัติด้วยความระมัดระวัง ซึ่งการปนเปื้อนจาก *S. aureus* ในอาหารที่สิ้นสุดกระบวนการผลิตนั้นอาจบอกได้ว่าอาหารนั้นมีสุขอนามัยที่ต่ำ และถ้าเป็น *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินจะทำให้อาหารเป็นพิษ ก่อให้เกิดโรค

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

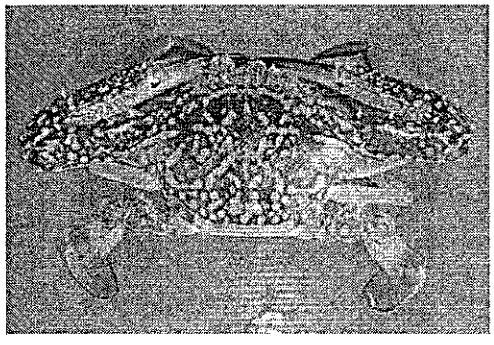
จากการรายงานในสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1988 ถึง ค.ศ. 1992 พบการปนเปื้อนของ *Staphylococcus* ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ สาเหตุหลักเกิดจากการเก็บอาหารในอุณหภูมิไม่เหมาะสมเป็นส่วนใหญ่ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการกระจายของ *Staphylococcus* ที่ทำให้อาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1988-1992 (Labbe & Garcia, 2001)

สาเหตุ	จำนวนการระบาด
เก็บอาหารที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม	37
ผู้ประกอบการขาดสุขอนามัยที่ดี	18
ประกอบอาหารให้ความร้อนไม่เพียงพอ	15
อุปกรณ์เกิดการปนเปื้อน	4
อาหารจากแหล่งที่ไม่ปลอดภัย	4
อื่น ๆ	4

การควบคุมอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* ทำได้โดยการดูแลเกี่ยวกับสุขวิทยาส่วนบุคคล หลีกเลี่ยงการใช้มือหยิบอาหารโดยตรง ล้างมือทุกครั้งหลังเข้าห้องน้ำ หรือหยิบจับต้องสิ่งของอื่นก่อนใช้มือสัมผัสอาหาร พึงระวังการปนเปื้อนข้ามจากอาหารดิบไปยังอาหารสุก เก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิที่ถูกต้อง การอุ่นอาหารให้ร้อนจะต้องอุ่นที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรีย (อุณหภูมิสูงกว่า 63 องศาเซลเซียส) (Bennet & Lancettle, 1998)

ปูม้า



ภาพที่ 5 ปูม้า (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. อนุกรมวิธานและลักษณะรูปร่าง

ปูม้าจัดอยู่ในกลุ่มปูว่ายน้ำ ชื่อภาษาอังกฤษว่า Blue Swimming Crab มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Portunus pegalicus* ลักษณะทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (Head) ส่วนอก (Thorax) และส่วนท้อง (Abdomen) ส่วนอกและส่วนหัวจะอยู่ติดกันรวมเรียกว่า Cephalothorax มีกระดอง หุ้มอยู่ตอนบน ทางด้านข้างทั้งสองของกระดองมีหนามข้างละ 9 อัน เรียกว่า Anterolateral Tooth มีขาทั้งหมด 5 คู่ คู่แรกเปลี่ยนไปเป็นก้าม ลักษณะยาวเรียว มีสัน เพื่อป้องกันตัวและจับอาหาร ขาเดินมี 3 คู่ มีขนาดเล็กปลายแหลม กรรเชียงว่ายน้ำ 1 คู่ มีลักษณะเป็นใบพาย หนามของกระดองคู่สุดท้ายมีขนาดใหญ่และยาวที่สุด กระดองแบนกว้างมากมีตุ่มเล็ก ๆ กระจายทั่วไป ตัวผู้มีก้ามยาวเรียวกว่ายาวประมาณ 3 เท่าของกระดอง ส่วนท้องของตัวผู้จะเป็นรูปสามเหลี่ยมเล็กและแคบยาว มีสีฟ้าอ่อนและมีจุดขาวตกกระทั่วไปบนกระดองและก้ามพื้นท้องเป็นสีขาว ตัวเมียมีก้ามสั้นกว่า กระดองและก้ามมีสีฟ้าอมน้ำตาลอ่อน ส่วนท้องเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้างกว่าตัวผู้ มีจุดขาวประทั่วไปทั้งกระดองและก้าม มีถิ่นอาศัยอยู่ตามปากแม่น้ำ หรือบริเวณชายฝั่งทะเล โดยกินซากพืชและสัตว์ที่ตายแล้วเป็นอาหาร มีขนาดลำตัวประมาณ 15-20 เซนติเมตร (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2549)

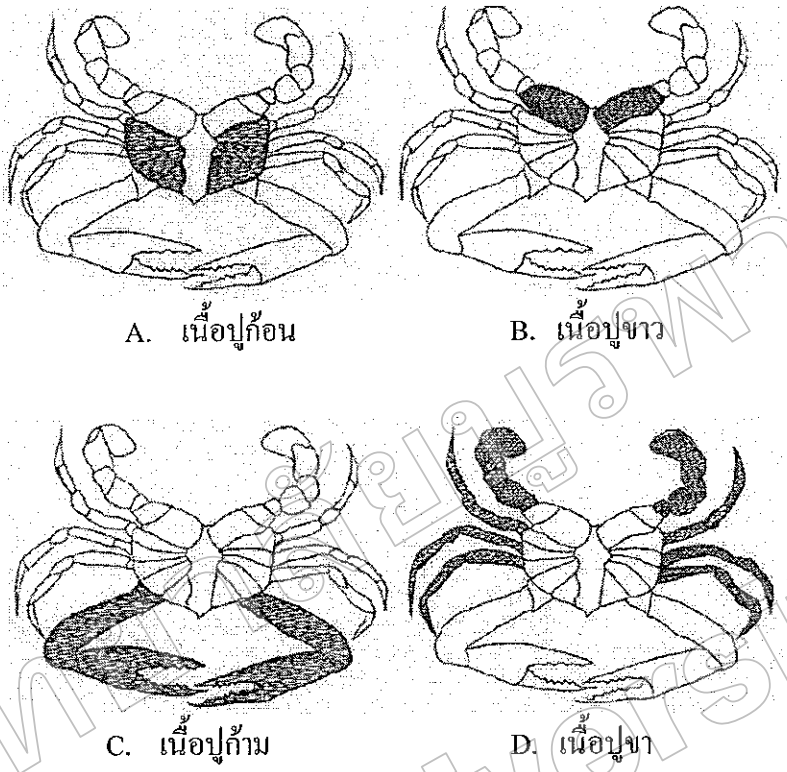
2. ลักษณะทั่วไป

ปูม้าจัดเป็นปูขนาดใหญ่ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย โดยพบการแพร่กระจายของปูม้าทั้งทางฝั่งอันดามันและอ่าวไทย เป็นสัตว์น้ำที่ประชาชนหันมาบริโภคกันมากขึ้นโดยมีผลผลิตรวมที่ได้จากการทำประมงในปี 2538 ปริมาณ 41,200 ตัน มีมูลค่า 1,879 ล้านบาท และเป็นผลิตภัณฑ์ประมงส่งออกที่สำคัญ มีรายงานว่าในปี พ.ศ. 2535-2539 ได้มีการส่งออกสู่ประเทศไต้หวันและฝรั่งเศสในรูปของปูแช่เย็น คิดเป็นมูลค่าประมาณ 185.43 ล้านบาท และส่งออกประเทศออสเตรเลีย ยุโรป แคนาดาและสหรัฐอเมริกา ในรูปของเนื้อปูกระป๋องคิดเป็นมูลค่า 1,023.44 ล้านบาท (กรมประมง, 2541) นอกจากมีความสำคัญในการส่งออกแล้ว ปูม้ายังเป็นที่ต้องการของตลาดท้องถิ่นอย่างมาก โดยจำหน่ายในรูปปูม้าต้มและปูม้าแกะเนื้อ เนื่องจากเนื้อปูม้ามีคุณสมบัติดี คือ โมเลกุลมีความสามารถยึดเหนี่ยว คงรูปได้ดีกว่าปูทะเล (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2549)

3. การผลิตเนื้อปูม้าต้มสุก

การแปรรูปปูม้าสดเป็นปูม้าแกะทำได้โดยนำปูม้าสดไปต้มที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นนำปูที่ต้มแล้วไปแกะด้วยมือ โดยแยกตามส่วนต่าง ๆ ของเนื้อปู ดังภาพที่ 6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



A. เนื้อปูก้อน B. เนื้อปูขาว

C. เนื้อปูก้าม D. เนื้อปูขา

ภาพที่ 6 ส่วนต่าง ๆ ของเนื้อปูแกะ (มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2548)

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, จุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์ และธัญลักษณ์ นินบดี (2522) ศึกษาการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* รวม 158 สายพันธุ์ จาก 149 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ดิบ อาหารทะเลปรุงสุกแช่แข็ง สลัด ขนมหวาน ไอศกรีม ผลไม้สด เครื่องดื่ม ปลาหมึกแห้ง และอีก 9 สายพันธุ์ แยกได้จากคนไข้ และเป็น *S. aureus* สายพันธุ์ที่ให้ผลโคแอกกูเลส เป็นบวก เมื่อทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินโดยวิธี Optimum Sensitivity Plate (OSP) พบว่า ร้อยละ 33.5 ผลิต SEA พบในอาหารที่ซื้อจากตลาดเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาร้อยละ 27.2 ผลิต SED โดยพบมากในตัวอย่างจากภัตตาคาร อาหารส่งออกแช่แข็ง และพบว่าร้อยละ 9.5 ผลิต SEA ร่วมกับ SED และร้อยละ 29.8 เป็นกลุ่มที่จำแนกไม่ได้ สำหรับอาหารทะเลปรุงสุกแช่แข็ง พบการผลิตทั้ง SEA และ SED

เพ็ญศรี รอดมา, ทนง สัจจปาละ และภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา (2534) ศึกษา *S. aureus* ในอาหารแช่แข็ง ได้แก่ ปลาหมึก กุ้ง ปลา และสับปะรดแช่แข็ง ชนิดละ 250 ตัวอย่าง รวม 1,000 ตัวอย่าง โดยเก็บจากโรงงานอาหารแช่แข็ง 52 แห่ง ตัวอย่างทั้งหมดผ่านกระบวนการทำเยือกแข็งและเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอจำหน่าย พบว่า ในตัวอย่างปลาหมึก กุ้ง ปลา และสับปะรด

มี *S. aureus* ร้อยละ 4.4 7.2 4.0 และ 4.4 ตามลำดับ โดยร้อยละ 5 ของตัวอย่างทั้งหมดพบอยู่ระหว่าง 3.0-4.3 MPN/ g และร้อยละ 4 พบไม่เกิน10 MPN/ g การตรวจพบ *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางด้านสุขลักษณะ แสดงให้เห็นว่าขบวนการผลิตบกพร่อง แต่ปริมาณปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่างอาหารที่ศึกษาพบว่าต่ำกว่าข้อกำหนดโดยทั่วไปของประเทศผู้นำเข้า

เนาวรัตน์ สุพรรณภาชน์ (2540) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารทะเลผ่านความร้อนแช่เยือกแข็งที่ผลิตในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2536 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2539 จำนวน 1,112 ตัวอย่างจากโรงงานผลิตที่อยู่ในจังหวัดสงขลา นครราชสีมา สตูล ปัตตานี และตรัง โดยใช้วิธี MPN พบว่ามีการปนเปื้อนของ *S. aureus* 39 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.51) ในปริมาณระหว่าง 3.0-4.3 MPN/ g โดยแยกชนิดอาหารเป็น 4 ชนิด คือ กุ้งผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง ปลาบดปรุงรสผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง ปลาหมึกผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง และอาหารทะเลผ่านความร้อนแช่เยือกแข็ง ซึ่งพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ร้อยละ 3.26, 3.13, 1.62 และ 7.63 ของอาหารแต่ละชนิด ตามลำดับ

สวรรณมนท์ เหล็กเพ็ชร์ (2546) สำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของก๋วยเตี๋ยวสดชนิดเส้นใหญ่จำหน่ายในตลาดเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 57 ตัวอย่าง และจากโรงงาน จำนวน 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 62 ตัวอย่าง พบว่าก๋วยเตี๋ยวสดชนิดเส้นใหญ่มี *S. aureus* น้อยกว่า 10 ถึงมากกว่า 2.5 x10^4 เซลล์ต่อกรัม อายุการเก็บและคุณภาพของก๋วยเตี๋ยวจากโรงงานเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) มีอายุการเก็บ 1 วัน สำหรับ *S. aureus* เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเจริญเพิ่มจำนวนได้ และที่อุณหภูมิแช่เย็น *S. aureus* รอดชีวิตอยู่ได้โดยไม่เพิ่มจำนวน ในขณะที่อุณหภูมิ แช่แข็งลดจำนวน *S. aureus* ได้ *S. aureus* รอดชีวิตได้ในสภาวะการเก็บทั้งสองอุณหภูมิโดยไม่เพิ่มจำนวน เมื่อนำก๋วยเตี๋ยวผัดแช่แข็งมาทำละลายด้วยไมโครเวฟ (88 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที) 1 รอบ *S. aureus* รอดชีวิตอยู่ได้ และเมื่อทำแช่แข็ง-ละลายซ้ำ 3 รอบ จะลดจำนวน *S. aureus* จาก 5 Log เซลล์ต่อกรัมหลือ 2 Log เซลล์ต่อกรัม

Ellender, Huang, Sharp, and Tettleton (1995) ศึกษาระดับแบคทีเรียในเนื้อปูแช่แข็งโดยคัดแยกหาจำนวนและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ในเนื้อปูแช่แข็งจากตลาดขายปลีก 3 แหล่งของประเทศสหรัฐอเมริกา คือ Mississippi, Alabama และ Louisiana (แหล่งละ 10 ตัวอย่าง) นับจำนวนโคโลนีโดยใช้อาหารสำหรับคัดแยก *Staphylococcus* 4 ชนิด และบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 และ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ Spread-Plate Food and Drug Administration Baird-Parker (FDABP48-35) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใหม่ให้ผลคล้ายคลึงกับวิธีมาตรฐาน ดังนี้ พบแบคทีเรียรูปกลมร้อยละ 91.5 แกรมบวกรูปท่อนร้อยละ 8.3 และแกรมลบร้อยละ 0.2 และเมื่อนำทุกไอโซเลทมาทดสอบ

โคแอกกูเลส พบว่าให้ ผลโคแอกกูเลสลบร้อยละ 97.7 และจาก 100 ไอโซเลท นำมาจำแนกด้วยวิธี BIOLOG พบว่า ร้อยละ 62 เป็น *S. lentus, S. hominis* และ *S. epidermidis* และพบ 3 ไอโซเลทที่เป็น *S. aureus*

Gonzalez-Fandos et al. (1996) ศึกษาการติดตามผลของหัวเชื้อหมักเนื้อที่ไม่มี Lactic Acid Bacteria เป็นส่วนผสมที่มีผลต่อการเจริญ การผลิตสารพิษของ *S. aureus* โดยเพาะเลี้ยง *S. aureus* 4 สายพันธุ์ ที่ผลิต SEA, SEB, SEC_1 และ SED ร่วมกับ *Micrococcus varians* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^5, 10^6 และ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่า *M. varians* ไม่มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของ *S. aureus* และจำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *M. varians* ไม่ส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของการผลิตสารพิษ และศึกษาผลของ *Staphylococcus* โคแอกกูเลสลบ ซึ่งประกอบด้วย *S. xylosus S. saprophyticus* และ *S. carnosus* ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของ *S. aureus* 4 สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่ามีผลการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ทั้งหมดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่สามารถลดการผลิต SEA, SEB และ SED ได้ และสามารถป้องกันการผลิต SEC_1 ได้

Onoue and Mori (1997) ศึกษาความต้องการกรดอะมิโนของ *S. aureus* 5 สายพันธุ์ ที่ผลิต SEA, SEB และ SEC ในการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าวาลีน (Valine) จำเป็นสำหรับการเจริญ ขณะที่อาร์จินีน (Arginine) และซีสตีน จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซิน ดังนั้นการขาดไปของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีผลต่อการผลิตเอนเทอโรทอกซินที่แตกต่างกัน

Rosec, Guiraud, Dalet, and Richard (1997) รายงานการแยก *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินจากอาหารในประเทศฝรั่งเศส โดยเก็บตัวอย่าง 121 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่เป็นอาหาร (ชีสที่ทำจากนมดิบ ขนมปังปิ้ง อาหารปรุงสำเร็จ เนื้อหมูสุกหรือดิบ ไอศกรีม เนื้อบด และแป้งหมี่) ตัวอย่างส่วนที่เหลือมาจากส่วนของผิวหนัง จากตัวอย่างทั้งหมดสามารถคัดแยก *Staphylococcus* ได้ 264 สายพันธุ์ โดยเป็น *S. aureus* 213 สายพันธุ์และอีก 51 สายพันธุ์เป็น *Staphylococcus* อื่น จากนั้นนำไปทดสอบการผลิตสารพิษ พบว่า *S. aureus* ร้อยละ 30.5 ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ขณะที่ *Staphylococcus* ที่ให้ผลโคแอกกูเลสเป็นลบไม่ผลิตสารพิษ และเมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างชีสนมดิบ พบว่าแหล่งการปนเปื้อนเบื้องต้นคืออาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่า *S. aureus* ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากมนุษย์นั้นสามารถผลิตเอนเทอโรทอกซิน โดยพบ SEC เด่นที่สุด ร้อยละ 66 จากทั้งหมดที่ผลิตสารพิษ จากผลการศึกษานี้จึงเกิดแนวคิดใหม่ว่า SEC จะเป็นสายพันธุ์ที่น่าศึกษาในอนาคต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Adesiyun, Webb, and Roman (1998) ศึกษาการแพร่กระจายและลักษณะของ *S. aureus* สายพันธุ์ที่แยกจากนมก่อนบรรจุ นมบรรจุกล่อง และมือของผู้ประกอบการผลิต (การรีดนม) จากฟาร์มนมในประเทศตรินิแดด ซึ่งเก็บตัวอย่างจากทั้งหมด 5 แหล่ง จากตัวอย่างทั้งหมดพบ *S. aureus* ในตัวอย่างนมก่อนบรรจุร้อยละ 100 ขณะที่พบในนมบรรจุกล่องร้อยละ 97.6 และนับจำนวน *S. aureus* ในนมก่อนบรรจุได้ $5.9x10^3$ ถึง $1.2x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการพบในนมบรรจุกล่อง และเมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซิน พบ *S. aureus* ผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ ซึ่งพบทั้ง SEA, SEB, SEC และ SED ส่วนในนมบรรจุกล่องพบ *S. aureus* ผลิตเอนเทอโรทอกซินร้อยละ 47.3 และจากการคัดแยก *S. aureus* จากผู้ประกอบการ พบ *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินร้อยละ 45.2 การที่พบการกระจายของ *S. aureus* ในตัวอย่างนมก่อนบรรจุและในนมบรรจุกล่องนั้นเนื่องจาก *S. aureus* สามารถทนต่อยาต้านจุลชีพได้ถึง 9 ชนิด โดยพบจำนวน *S. aureus* ที่ดื้อยาร้อยละ 18.7 และ 12.9 ตามลำดับ และถ้าเปรียบเทียบกับ *S. aureus* ที่แยกจากมือผู้ประกอบการที่พบอัตราดื้อยาเป็นร้อยละ 69.5 นั้น สามารถบอกได้ว่าสาเหตุการแพร่กระจายของ *S. aureus* น่าจะมาจากผู้ประกอบการเป็นหลัก นอกจากนี้ยังกล่าวได้ว่า นมก่อนบรรจุเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคเช่นกัน เนื่องจากพบ *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ในจำนวนที่สูง

Meyrand et al. (1998) ศึกษากระบวนการผลิตชีสจากนมแกะดิบต่อการเจริญและการรอดชีวิตของ *S. aureus* ที่มีการเติมเชื้อลงในนมก่อนการผลิต และศึกษาการผลิต SEA ในชีส โดยเติมเชื้อให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 2, 3, 4, 5 และ 6 Log เซลล์ต่อกรัม จากการศึกษาพบว่า จำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นอัตราที่เท่ากันในระหว่างกระบวนการผลิตชีส และที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^3-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นั้นก็สามารถตรวจวัดปริมาณของ SEA ได้อยู่ในช่วง 1-3.2 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ส่วนที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำมาก ๆ นั้น ไม่สามารถตรวจวัดเอนเทอโรทอกซินได้

Sameshima et al. (1998) ศึกษาอิทธิพลของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ ในการเป็นหัวเชื้อหมักไส้กรอก ต่อการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^4 เซลล์ต่อกรัม และ *Lactobacillus* ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัม เก็บตัวอย่างไส้กรอกในระหว่างการหมัก เพื่อวิเคราะห์ พีเอช และจำนวนจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *Lactobacillus* รวมทั้งตรวจสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินระหว่างกระบวนการผลิตที่แต่ละอุณหภูมิที่ศึกษา พบว่า *Lactobacillus* จากลำไส้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. *L. rhamosus* FERM P-15120 *L. paracasei* FERM P-15121 มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกทั้งสองอุณหภูมิ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Desmarchelier, Higgs, Mills, Sullivan, and Vanderlinde (1999) ศึกษาการปนเปื้อนของ Coagulase Positive *Staphylococcus* (CPS) ในซากเนื้อจากโรงฆ่าสัตว์ 3 แห่งในประเทศออสเตรเลีย (โรงฆ่าสัตว์ A, B และ C) โดยเก็บตัวอย่างในระหว่างกระบวนการฆ่าสัตว์ ดังนี้ จุดที่หนึ่ง เก็บทันทีหลังจากชำแหละ จุดที่สอง เก็บตัวอย่างหลังจากลอกหนังออก จุดที่สาม เก็บตัวอย่างหลังจากแล่ จุดที่สี่ เก็บตัวอย่างหลังจากล้างครั้งสุดท้าย จุดที่ห้า หลังจากแช่แข็งข้ามคืน และจุดที่หก หลังจากแช่แข็งไป 1 สัปดาห์ พบอุบัติการณ์ของ CPS จากหนังสัตว์ในช่วงร้อยละ 20-68.6 ที่โรงฆ่าสัตว์ A พบการปนเปื้อนของ CPS ก่อนการแล่ร้อยละ 6.5 แต่หลังจากแล่แล้วพบสูงถึงร้อยละ 40 และพบว่าการปนเปื้อนของร่างสัตว์จะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระหว่างกระบวนการที่นานขึ้น อย่างไรก็ตามหลังจากแช่แข็งนาน 72 ชั่วโมง การระบาดก็จะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 83 หลังจากการแล่ พื้นที่หน้าอกและสีข้างพบการปนเปื้อนบ่อยมากกว่ารอบ ๆ ส่วนในโรงฆ่าสัตว์ B พบการปนเปื้อนในลักษณะเดียวกันและในโรงฆ่าสัตว์ C นั้นพบการปนเปื้อนของ CPS ก่อนการแล่เป็นร้อยละ 26.7 และลดลงเหลือร้อยละ 16.7 หลังจากผ่านการแล่ และเมื่อนำไปแช่แข็งนาน 72 ชั่วโมง พบว่า CPS เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 46.7 จำนวนการปนเปื้อน CPS บนซากสัตว์นั้น ก่อนและหลังการแช่แข็งข้ามคืนมีจำนวนน้อยกว่า 50 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และหลังจากแช่แข็งนาน 2 สัปดาห์ จะเพิ่มขึ้นเป็น 64 และ 112 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในโรงฆ่าสัตว์ A และ B ตามลำดับ จากไอโซเลทที่แยกได้นำมาทดสอบ พบว่าร้อยละ 71.4 ผลิตเอนเทอโรทอกซินและร้อยละ 21 ไม่สามารถระบุได้ นอกจากนี้ยังศึกษาผลจากมือผู้ปฏิบัติงานและตำแหน่งที่ปฏิบัติงานในระหว่างกระบวนการแล่ต่อการระบาดโดยทำในโรงฆ่าสัตว์ A พบว่า มือผู้ปฏิบัติงานมีผลต่อการปนเปื้อนสูงและตำแหน่งโรงฆ่าสัตว์ก็มีผลต่อการปนเปื้อนเช่นกัน

Doan and Davidson (1999) ติดตามการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในมันฝรั่งทอด โดยถ่ายเชื้อลงในมันฝรั่งดิบ (หั่น) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^5 เซลล์ต่อกรัม และ 10^3 เซลล์ต่อกรัม จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 21 และ 26.7 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์จำนวน *S. aureus* ที่เวลา 0, 0.5, 1, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตเอนเทอโรทอกซินด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป ELISA โดยนำตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 5, 7 และ 9 มาทดสอบทั้งก่อนและหลังการทอด จากการศึกษาพบว่า จำนวน *S. aureus* ในมันฝรั่งดิบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส เพิ่มจาก 2.5 Log เซลล์ต่อกรัม เป็น 2.8 Log เซลล์ต่อกรัม เมื่อเก็บรักษานานกว่า 9 ชั่วโมง สำหรับการผลิตเอนเทอโรทอกซิน ตรวจพบได้เมื่อเก็บมันฝรั่งนานกว่า 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26.7 องศาเซลเซียส การเก็บมันฝรั่งเป็นเวลาน้อยกว่า 3-4 ชั่วโมง ก่อนนำไปทอดจะเป็นการป้องกันการผลิตเอนเทอโรทอกซินได้

Qi and Miller (2000) ศึกษาผลของวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำต่อการสังเคราะห์ SEA และ SEB ทั้งในระดับ Transcription และ Translation โดยใช้ *S. aureus* สายพันธุ์ FDA 743 (คัดแยกจากไข่ผงและผลิต SEA) FDA 778 (ผลิต SEA และ SEB) และ S6 (ที่ผลิต SEA และ SEB) เช่นกัน โดยใช้ *S. aureus* ATCC 13565 ที่ผลิต SEA เป็นเชื้ออ้างอิง โดยเฉพาะเลี้ยง *S. aureus* ในอาหาร Define Growth Medium (DFM) ที่มีกรดอะมิโน วิตามิน และกลูโคส โดยค่าวอเตอร์แอกทิวิตีของอาหาร DFM ปรับให้ค่าสุดท้ายที่ 0.97 ด้วยโซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรอล หรือซูโครส และปรับเป็น 0.95 ด้วยโซเดียมคลอไรด์ และในการทดลองบางส่วนมีการเติม ไกลซีน โพรลีน หรือคาร์นิทีน จากการทดลองพบว่าการผลิต SEB จะไวต่อวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำมากกว่าการผลิต SEA และเมื่อมีการเติม โพรลีนพบว่า การผลิต SEB จะถูกกระตุ้นได้ที่วอเตอร์แอกทิวิตีต่ำ ซึ่งมีการศึกษาต่อถึงระดับการสังเคราะห์ SEB ด้วยวิธี Northern Blot พบว่า การกระตุ้นการผลิต SEB ที่มีการเติมโพรลีน เกิดขึ้นได้ในระดับ Transcription

Atanassova, Meindl, and Ring (2001) ศึกษาการแพร่กระจายของ *S. aureus* และการผลิตเอนเทอโรทอกซินระหว่างกระบวนการผลิตแฮมตั้งแต่เนื้อหมูดิบ เนื้อหมูหมักเกลือและแฮมรมควัน (พร้อมจำหน่าย) ที่ยังไม่ผ่านการให้ความร้อน จำนวนทั้งหมด 135 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบด้วย 2 วิธีคือจำแนกบนอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับเทคนิค RFLP-PCR และเปรียบเทียบการตรวจวัดเอนเทอโรทอกซิน ด้วยวิธี PCR กับการตรวจสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป SET-RPLA จากการ ศึกษาพบ *S. aureus* ร้อยละ 25.9 เมื่อจำแนกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่วิธี PCR ให้ผลการตรวจพบ *S. aureus* ถึงร้อยละ 51.1 ในเนื้อหมูดิบนั้นพบ *S. aureus* มากที่สุด คือร้อยละ 62.2 เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR และพบร้อยละ 57.7 เมื่อจำแนกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการตรวจวัด *S. aureus* ด้วยวิธีทั้งสองในระหว่างกระบวนการผลิตนั้น พบ *S. aureus* จะลดลงในขั้นตอนการหมักเกลือและพบน้อยที่สุดในตัวอย่างที่ผ่านการรมควันพร้อมจำหน่าย โดยพบด้วยวิธี PCR เป็นร้อยละ 55.6 และ 35.6 ตามลำดับ สำหรับวิธีเลี้ยงเชื้อทั่วไปพบร้อยละ 8.9 และ 11.1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า วิธี PCR มีความไวมากกว่าวิธีเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน และการตรวจวัดการผลิตเอนเทอโรทอกซิน ของ *S. aureus* ด้วยวิธี PCR นั้น พบการผลิตเอนเทอโรทอกซิน หนึ่งชนิด หรือมากกว่าในตัวอย่างทั้งหมดเป็น ร้อยละ 34.8 และเมื่อใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป SET-RPLA พบเอนเทอโรทอกซินร้อยละ 28.6

Yang, Yu, and Chou (2001) ศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของ *Staphylococcus* ในตัวอย่างไข่นึ่งและไข่กวน โดยติดตามที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5, 18, 22, 37, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และศึกษาการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในไข่นึ่ง โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากการประกอบขึ้นเองตามสูตรในไต้หวัน ซึ่งประกอบด้วย ไข่ น้ำ เกลือ และโซเดียมกลูตาเมท และน้ำมันสลัด

จากนั้นผสมให้เข้ากัน โดยถ่ายเชื้อลงบนตัวอย่างที่จำนวนเชื้อประมาณ 10^{1}-10^{5} เซลล์ต่อกรัม จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37, 22, 18 และ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่า *S. aureus* เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 22 และ 18 องศาเซลเซียส และไม่การเจริญที่ 5 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังพบได้ว่าขนาดของแบคทีเรียเริ่มต้น อุณหภูมิที่เก็บรักษา มีผลต่อการเจริญ *S. aureus* จากการตรวจวัดเอนเทอโรทอกซิน พบทั้ง SEA และ SEB ในผลิตภัณฑ์ไข่ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 22 องศาเซลเซียส และหลังจากเก็บไข่กวนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง จะพบ *S. aureus* ในตัวอย่างสูงถึง 5 Log เซลล์ต่อกรัม และพบ SEA และ SEB สูงที่สุด (มากกว่า 64 นาโนกรัมต่อกรัม) ถึงแม้ว่า *S. aureus* จะเจริญในไข่นึ่งได้ดีกว่าไข่กวนแต่พบว่าสารพิษจะถูกผลิตในไข่กวนสูงกว่า

Portocareo et al. (2002) ศึกษาการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินและความคงตัวระหว่างการเก็บของแฮมรมควันที่ถูกผลิตขึ้นภายใต้กระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน โดยการเติม *S. aureus* ลงในแฮมสดที่นับจำนวนแบคทีเรียบริเวณผิวตัวอย่างก่อน จากนั้นนำตัวอย่างแบ่งเป็น 2 ส่วนโดยส่วนแรกนำไปหมักด้วยเกลือ และส่วนที่ 2 นำไปหมักด้วยเกลือและไนไตรท์ และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ระหว่างขั้นตอนการผลิต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 65 เป็นระยะเวลา 6 เดือน วิเคราะห์ตัวอย่างทุก 1 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ *S. aureus* จากการศึกษาพบว่า บนแฮมสดมี *S. aureus* ปริมาณน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อกรัม และเมื่อมีการเติม *S. aureus* ลงไปจะพบ *S. aureus* บนแฮมที่หมักด้วยเกลือและที่หมักด้วยเกลือกับไนไตรท์ 8.57 และ 8.12 Log เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปรมควัน พบว่า *S. aureus* ลดลง 2 Log เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ของทั้งสองตัวอย่าง และระหว่างการเก็บรักษา พบว่า *S. aureus* ลดลงอย่างต่อเนื่องในตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือทั้งแบบรมควันและไม่รมควัน ส่วนในตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือกับไนไตรท์ ที่ไม่ได้รมควันลดลงเพียงเล็กน้อย ส่วนที่รมควันมีจำนวน *S. aureus* เพิ่มขึ้น และเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาแล้ว นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ *S. aureus* พบเชื้อในตัวอย่างร้อยละ 75 สำหรับ *Staphylococcus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินพบร้อยละ 40 ในตัวอย่างที่เติมเชื้อ ส่วนในชุดควบคุมพบร้อยละ 50 จากการศึกษานี้สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณเกลือที่สูงและค่าวอเตอร์แอกทิวิตีที่ต่ำของแฮมรมควัน มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus*

Carmo, Dias, Linardi, Sena, and Santos (2003) ศึกษาการระบาดของ *Staphylococcus* ที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ ในเขตเทศบาล Minas Gerais ประเทศบราซิล ซึ่งเกิดการระบาดในผู้ป่วย 42 ราย ที่รับประทานอาหารจากร้านอาหารแห่งหนึ่งในเมือง โดยมีรายงานว่า 31 รายมีอาการป่วยหลังจากรับประทานอาหาร 30 นาที โดยแสดงอาการอาเจียน ท้องร่วง และวิงเวียนศีรษะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ซึ่งอาหารที่รับประทานประกอบด้วยแพนเค้กไก่ ข้าว ถั่ว ซอสมะเขือเทศ ในการศึกษาได้หาสาเหตุที่มาของเชื้อโดยมีการจัดสุขอนามัยในเขตเทศบาล จากนั้นก็เริ่มติดตามการระบาด วิเคราะห์หาแหล่งที่มาของการปนเปื้อน เก็บตัวอย่างจากโพรงจมูก คอ และเล็บของผู้ประกอบอาหาร พบว่าแบคทีเรียมากกว่า $2.0x10^5$ เซลล์ต่อกรัม เป็น *Staphylococcus* ที่ผลิตสารพิษโดยพบในแพนเค้กไก่เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตทั้ง A, B และ D และพบว่าแหล่งที่มาคือตัวผู้ประกอบการ จากรายงานครั้งนี้สามารถบอกได้ว่าผู้ประกอบอาหารเป็นแหล่งที่มาของการปนเปื้อน *Staphylococcus* ที่ผลิตสารพิษ

Lara et al. (2003) ศึกษาการประเมินการรอดชีวิตและการผลิตเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในเนื้อแห้งที่ผลิตในประเทศบราซิล โดยติดตามกระบวนการผลิตเนื้อแห้งในห้องปฏิบัติการซึ่งเก็บตัวอย่างเนื้อดิบจำนวน 15 ตัวอย่าง จากตลาดสด จากนั้นเข้าสู่กระบวนการผลิตเนื้อแห้ง คือ แช่น้ำเกลือ ตากแห้ง แช่เกลือ ตากแห้ง แช่เกลืออีกครั้ง ผึ่งให้ สะเด็ดน้ำ และตากแดด โดย *S. aureus* จะถูกติดตามในช่วงเนื้อดิบ แช่น้ำเกลือครั้งที่สอง ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ตากแดด และระหว่างการเก็บรักษาที่ 30 วัน และ 60 วัน จากการติดตามในกระบวนการผลิตทั้งหมดพบว่าสภาวะที่ใช้ในการผลิต ความเข้มข้นเกลือที่สูง อุณหภูมิที่ใช้ ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี จะยับยั้งการเจริญของทั้งสองชนิด โดยขณะที่ติดตามภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ *S. aureus* สามารถรอดชีวิตได้ในขั้นตอนการแช่เกลือ ตามลำดับ คือ การแช่น้ำเกลือ การตากแห้ง และการตากแดด แต่ท้ายที่สุดเมื่อผลิตภัณฑ์มีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี 0.70-0.75 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้

Aycicek, Cakiroglu, and Stevenson (2005) ศึกษาการระบาดของ *S. aureus* ในอาหารพร้อมรับประทานจากศูนย์อาหารใน Ankary ประเทศตุรกี จากตัวอย่าง 512 ตัวอย่าง ประกอบด้วยสลัดรัสเซียน สลัดผักและเนื้อก้อนพบ *S. aureus* สูงกว่า (มากกว่า 4 Log เซลล์ต่อกรัม) ตัวอย่างที่เป็น Hamburger Patties Pizza, Turkish Lahmacum, Turkish Pide และ Turkish Doner จากข้อมูลเหล่านี้สามารถบอกได้ว่าการปนเปื้อนของ *S. aureus* นั้นมาจากการประกอบอาหารด้วยมือที่ส่งผลให้เชื้อมีโอกาสสัมผัสกับอาหาร

Ikeda, Morimoto, Makino, and Yamaguchi (2005) ศึกษาถึงความถี่ในการปนเปื้อน *S. aureus* ในการผลิตชีสในเมือง Hokkaido ประเทศญี่ปุ่นเนื่องจากพบว่าในเมืองมีแนวโน้มการผลิตชีสเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้ประกอบการขนาดเล็ก ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง โดยเก็บตัวอย่างชีสในเมือง Hokkaido เป็นเวลา 3 ปี ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2002-2004 ในปี ค.ศ. 2002 เก็บตัวอย่างจาก 61 โรงงาน จำนวน 171 ตัวอย่าง ปี ค.ศ. 2003 เก็บจาก 60 โรงงาน จำนวน 168 ตัวอย่าง และในปี ค.ศ. 2004 เก็บจาก 65 โรงงาน จำนวน 196 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้มีจำหน่ายในตลาดขายปลีกทั่วไป จากการนับจำนวน *S. aureus* ทั้งโดยตรง (นับจำนวนโคโลนี) และแบบ MPN พบ *S. aureus* ทั้งหมด 38 ตัวอย่าง โดยพบในปี ค.ศ. 2002-2004 คิดเป็นร้อยละ 8.2 3.6 และ 9.2 ตามลำดับ และ

ในปี 2004 นั้น พบจำนวน *S. aureus* สูงสุดเป็น $2.2x10^4$ เซลล์ต่อกรัม จากนั้นนำ *S. aureus* ที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR เพื่อหา *se* gene ทั้ง 7 ชนิด พบว่า จาก 38 ไอโซเลท พบ *se* gene จาก 18 ไอโซเลท ซึ่งพบเป็น *sei* และ *seg* gene จำนวน 13 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบว่า ไม่มีตัวอย่างชีสที่สามารถตรวจพบการผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป เพราะส่วนใหญ่ในการผลิตเอนเทอโรทอกซินต้องมีจำนวน *S. aureus* สูงถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมของอาหารที่ทดสอบ จากการศึกษาข้างต้นจึงกล่าวได้ว่าการผลิตชีสในเมือง Hokkaido มีปัญหาการปนเปื้อนและการผลิต เอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ในระดับต่ำ

Ingham et al. (2005) ศึกษาการเจริญของ *S. aureus* บนตัวอย่างอาหารพร้อมรับประทานที่ควบคุมค่าวอเตอร์แอกทิวิตีและพีเอชให้แตกต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมรับประทานชนิดต่าง ๆ จำนวน 34 ตัวอย่าง จากนั้นถ่าย *S. aureus* ที่ผสมกัน 3 สายพันธุ์ ลงในตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างในถุงสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในตัวอย่างที่มีพีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.1 จำนวน *S. aureus* ลดลงทุกสัปดาห์ ซึ่งลดลงประมาณ 1.1-5.6 Log เซลล์ต่อกรัม โดยให้ผลลักษณะเดียวกับ *S. aureus* ในตัวอย่างที่มีค่าวอเตอร์แอกทิวิตีน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.82 ที่พบจำนวน *S. aureus* ลดลงในช่วง 3.2-4.5 Log เซลล์ต่อกรัม แตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ผ่านการหมักหรือการแตกแห้ง จะส่งผลให้ *S. aureus* เจริญได้และเก็บรักษาได้ไม่นาน

Normanno et al. (2005) รายงานการตรวจหา Coagulase Positive *Staphylococcus* (CPS) และ *S. aureus* ในอาหารทั่วไปจากตลาดในอิตาลี 9,869 ตัวอย่าง และ 1,515 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารในโรงงานผลิตอาหารในช่วงเดือนมิถุนายน ค.ศ. 2000 ถึง กรกฎาคม ค.ศ. 2002 โดยเก็บตัวอย่างในตลาดขายปลีก จากตัวอย่างทั้งหมด 11,384 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบ พบว่า 1,971 ตัวอย่าง (ร้อยละ17.3) มีการปนเปื้อนของ CPS 541 สายพันธุ์ โดยจำแนกได้ *S. aureus* ได้ 537 สายพันธุ์ และจาก *S. aureus* ทั้งหมดนั้น พบว่า ร้อยละ 55.5 สามารถผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ทั้งแบบหนึ่งชนิดและมากกว่า ดังนี้ ร้อยละ 33.9 ผลิต SEC, ร้อยละ 26.5 ผลิต SEA, ร้อยละ 20.5 ผลิต SEA กับ SED, ร้อยละ 13.4 ผลิต SED, ร้อยละ 2.7 ผลิต SEB, ร้อยละ 1.7 ผลิต SEA กับ SEB, ร้อยละ 0.7 ผลิต SEC กับ SED และร้อยละ 0.3 ผลิต SEA กับ SEC และ SEB กับ SEC

Ingham, Searls, Mohanan, and Buege (2006) ศึกษาการรอดชีวิตของ *S. aureus* ในเนื้อแห้งที่บรรจุสูญญากาศและความสัมพันธ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส รวมทั้งผลของค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ซึ่งในกระบวนการผลิตเนื้อแผ่นตากแห้งนั้นมีขั้นตอนการผ่านความร้อนเพื่อทำลายจุลินทรีย์ และตามด้วยการทำแห้ง เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษที่เกิดการปนเปื้อนหลังกระบวนการผลิตแล้ว เนื่องจากมีการรายงานค่าวอเตอร์แอกทิวิตีที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต่ำกว่า 0.88 จะจำกัดการเจริญของ *S. aureus* ได้ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำการทดลองโดยเติม *S. aureus* ลงในชิ้นตัวอย่างขนาดเล็ก บรรจุสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (21 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างวิเคราะห์เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 1 และ 4 สัปดาห์ หลังจากเก็บรักษานาน 1 สัปดาห์ พบ *S. aureus* ลดลง 0.2-1.8 Log เซลล์ต่อกรัม และพบลดลง 0.6-5.3 Log เซลล์ต่อกรัม หลังจากเก็บรักษา 4 สัปดาห์ ถึงแม้ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *S. aureus* มีมากกว่าค่าวอเตอร์แอกทิวิตี แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถบอกได้ว่า ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีของเนื้อแผ่นตากแห้งที่น้อยกว่า 0.88 นั้นทำให้ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University