บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Staphylococcus aureus และอาหารเป็นพิษ

1. ลักษณะทั่วไปและการจัดจำแนก *S. aureus*

1.1 ลักษณะทั่วไป

S. aureus เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปกลม มีการจัดเรียงเซลล์แบบเดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มไม่แน่นอน หรือเป็นสายสั้น บางครั้งมีการจัดเรียงคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (Schelin et al., 2011) มีขนาดเล็กประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร (Harris, Foster, & Richards, 2002) โคโลนีมีลักษณะสีเหลืองทอง ส้ม และขาว สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่เจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน (Bhatia & Zahoor, 2007) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6-48 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35-41 องศาเซลเซียส พีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 6.0-7.0 พีเอชที่เชื้อเจริญอยู่ระหว่าง 4.0-10.0 ลักษณะเด่นของแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococci คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูงมากถึงร้อยละ 20 ซึ่งตามปกติจะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีเกลือ (Schelin et al., 2011) หรือในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 (Vasconcelos & Cunha, 2010) และยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระ (Available Water; a_w) ต่ำถึง 0.86 ซึ่งต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่ม Non-Halophilic Bacteria (Argudin, Mendoza, & Rodicio, 2010) ค่า a_w ที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 0.99 (Schelin et al., 2011) บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนสูง ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรง (Vasconcelos & Cunha, 2010)

1.2 การจัดจำแนก

S. aureus จัดอยู่ในตระกูล Staphylococcaceae (Vasconcelos & Cunha, 2010) สามารถเจริญในอาหารที่มีกลูโคส เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแฟคคัลเททีฟ แอนแอโรบ (Facultative Anaerobe) ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะไร้ออกซิเจน *S. aureus* ที่ผลิตสารพิษส่วนใหญ่มักเป็นพวกที่สามารถสังเคราะห์ เอนไซม์โคแอกูเลส (Coagulase) ได้ (Vasconcelos & Cunha, 2010) จัดเป็นพวก Chemoorganotrophics คือ มีเมแทบอลิซึมของการหมักและการหายใจ (Schelin et al., 2011) สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ได้ บางสายพันธุ์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolytic) บนอาหาร Horse Blood Agar หมักแมนนิทอล (Mannitol) ได้ในสภาพไร้

ออกซิเจน ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการไทอะมีน (Thiamine) และกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) เมื่อเจริญในสภาพไร้ออกซิเจนต้องการยูราซิล (Uracil)

S. aureus มีลักษณะที่แตกต่างกับ *Staphylococcus* อีก 2 สปีชีส์ คือ *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* โดย *S. aureus* มีความสามารถสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสที่ทนความร้อน (Heat Stable Endonuclease หรือ Thermonuclease; TNase) และสามารถหมักแมนนิทอลได้ในสภาพไร้ออกซิเจน เอนไซม์โคแอกูเลส และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส เป็นเอนไซม์ที่ใช้สำหรับวินิจฉัยว่าแบคทีเรียที่สงสัยเป็น *S. aureus* หรือไม่ สำหรับเอนไซม์โคแอกูเลสเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอก เอนไซม์ชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับโพรทรอมบริน (Prothrombrin) ซึ่งปกติมีอยู่ในพลาสมา ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโคแอกูเลสกับทรอมบริน (Coagulase-Thrombin Complex) และในทางกลับกันก็จะเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibinogen) ในพลาสมาให้เป็นไฟบริน (Fibrin) ที่ละลายได้ให้อยู่ในรูปลิ่มที่แข็งตัว จากผลการวิจัยได้รายงานว่า การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลสที่ให้ผลการเกิดลิ่มต่ำกว่า 4+ แทบจะไม่ให้ผลการทดสอบที่บ่งชี้ว่าเป็นลักษณะของ *S. aureus* ส่วนใหญ่จะต้องให้ผลถึงระดับ 4+ จึงจะใช่ *S. aureus* ดังนั้นถ้าให้ผลการทดสอบต่ำกว่า 4+ ควรจะทำการทดสอบชนิดอื่นด้วยเพื่อยืนยัน ส่วนเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส สามารถย่อยสลายได้ทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) เอนไซม์ชนิดนี้ทนความร้อนได้ดีโดยไม่สูญเสียกิจกรรมหลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 30 นาที Staphylococci ส่วนใหญ่ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ได้ จะให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลสและเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (Food and Drug Administration [FDA], 2001; สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549)

1.3 แหล่งที่พบ

S. aureus เป็นจุลินทรีย์ที่มีความทนทานมากและสามารถอยู่รอดในสภาวะแห้งแล้งได้นาน อีกทั้งยังเจริญได้ในช่วงของอุณหภูมิและค่าพีเอชที่กว้าง ด้วยคุณสมบัตินี้จึงทำให้พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในอาหารได้หลากหลาย แหล่งของ *S. aureus* พบได้ทั่วไปในอากาศ ฝุ่น น้ำ น้ำเสีย นม และอาหาร ตลอดจนอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบการแปรรูปอาหาร (Bhatia & Zahoor, 2007) เช่น มีด เขียง เครื่องบดเนื้อ ภาชนะใส่อาหาร และอุปกรณ์อื่น ๆ ที่หมักหมมทำความสะอาดไม่ดีพอ (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549) จากการศึกษาเกี่ยวกับการระบาดวิทยาพบว่า คนและสัตว์ เป็นแหล่งสำคัญของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนมาสู่อาหาร (Schelin et al., 2011) โดยแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น (Normal Flora) (Doyle, Beuchat, & Montville, 1997) มักอาศัยอยู่บริเวณปลายเปิดของอวัยวะที่เป็นช่องทางติดต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกายของโฮสต์ เช่น ในโพรงจมูก ช่องคอ ช่องปาก และตามผิวหนัง เส้นผม บาดแผล ฝีหรือหนองของคนและสัตว์

มักพบเชื้อ *S. aureus* เป็นจำนวนมาก (Schelin et al., 2011; Kloos & Bennerman, 1994) *S. aureus* ยังเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคเต้านมวัวอักเสบและทำให้น้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนมเป็นพิษได้ การปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้จึงแสดงถึงสุขลักษณะการผลิตและการเก็บรักษาอาหารที่ไม่ดี (Doyle et al., 1997)

การปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในอาหาร มักมาจากการไอหรือจามลงในอาหาร หรือการได้รับเชื้อจากผิวหนัง หรือได้รับเชื้อภายหลังจากการพาสเจอไรซ์ ซึ่งมักมาจากมือของผู้ปรุงอาหาร (Argudin et al., 2010) อาหารที่ไม่ผ่านการหุงต้ม หรืออาหารสุก ๆ ดิบ ๆ อาหารที่พบเชื้อ *S. aureus* ได้บ่อย คือ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ไข่ สลัดทูน่า สลัดไก่ มะเขือเทศที่ใส่สลัด และอาหารพวกข้าวผัด มักกะโรนี (Bhatia & Zahoor, 2007) เป็นต้น

2. การสร้างสารพิษ

Staphylococci สามารถสร้างกลุ่มของสารพิษภายในเซลล์ แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหาร (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) เรียกว่า Pyrogenic Toxic Superantigens คือ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลทำให้เกิดอาการท้องเดิน ซึ่งประกอบด้วย Toxic-Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) และ Staphylococcal Enterotoxins (SEs) (Vasconcelos & Cunha, 2010) หรือ Enterotoxin-Like Proteins (SEls) (Schelin et al., 2011)

ในอดีตโรคอาหารเป็นพิษจำกัดอยู่เฉพาะสปีชีส์ (Species) เดียว คือ *S. aureus* แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าสปีชีส์อื่นก็สร้างสารพิษนี้ด้วย แต่เนื่องจากการตรวจสอบ Staphylococci อาศัยสมบัติการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส และเทอร์โมนิวคลีเอส (TNase) ของแบคทีเรียโดยเฉพาะ *S. aureus* สร้างเอนไซม์นี้ ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ จึงมุ่งไปที่ *S. aureus* เป็นสำคัญ หลังจากได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหารได้แล้ว จึงเป็นผลให้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย Staphylococci สปีชีส์อื่นนอกเหนือจาก *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินด้วย แต่มีโอกาสที่เกิดน้อยกว่า *S. aureus* (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

แบคทีเรียในจีนัส *Staphylococcus* มีอยู่หลายสปีชีส์ (Species) แต่ที่สามารถจัดจำแนกได้ในปัจจุบันมี 42 สปีชีส์ และ 24 สับ-สปีชีส์ (Sub-Species) (Vasconcelos & Cunha, 2010) แต่ที่พบในอาหารมีประมาณ 18 สปีชีส์ ในจำนวนนี้มีเพียง 6 สปีชีส์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส ส่วนมากสปีชีส์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส จะสร้างเอนไซม์เทอร์โมนิวคลีเอสด้วย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่ามีประมาณ 10 สปีชีส์ที่ไม่สร้างเอนไซม์ทั้งสอง แต่สร้างเอนเทอโรทอกซิน *Staphylococcus* สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมีลักษณะพิเศษ คือ จะไม่ทำให้เลือดตกตะกอนและไม่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลโดยการหมัก จากสมบัติดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่า รายงานการระบาดโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* ในอดีตน่าจะต่ำกว่าที่เกิดขึ้นจริง เพราะการตรวจวิเคราะห์

S. aureus นั้นอาศัยสมบัติของเอนไซม์โคแอกูเลส และเทอร์โมนิวคลีเอส เป็นสำคัญ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) การผลิตเอนไซม์โคแอกกูเลส (Coagulase) ทำให้แบ่ง *Staphylococcus* ออกเป็น 2 กลุ่มคือ พวกที่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (Coagulase-Positive Strains) ได้แก่ *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* และ *S. delphini* ส่วนพวกที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (Coagulase-Negative Strains) มีอีกมากกว่า 30 สปีชีส์ (Vasconcelos & Cunha, 2010)

ในปัจจุบันสารพิษที่สร้างโดย Staphylococci คือ Staphylococcal Enterotoxins (SEs) หรือ Enterotoxin-Like Proteins (SE*ls*) มี 21 ชนิด ได้แก่ SEA ถึง SE*l*V (Schelin et al., 2011) ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน (ตามตารางที่ 1) โดยทั่วไปพบว่าสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่สร้างโดย Staphylococci (SEs) เป็นเปปไทด์สายเดี่ยว ชนิดนิวทรัลโปรตีน (Nuetral Protein) จับกันเป็นห่วงที่เรียกว่า "ซิสไทน์ลูพ" (Cystine Loop) ด้วยแรงยึดไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโน มีค่าไอโซอิเลคทริค พอยท์ (Isoeletric Point; pI) ระหว่าง 5.7-8.6 (Jay, Loessner, & Golden, 2005) มีขนาดโมเลกุลโดยเฉลี่ย 22-28 กิโลดาลตัน (kDa) (Argudin et al., 2010) มีคุณสมบัติในการทนความร้อน (Heat-Stable Toxin) สารพิษที่พบทำให้อาหารเป็นพิษอยู่เสมอ คือ SEA (ร้อยละ 77) และ SED (ร้อยละ 37.5) (Halpin & Marth, 1989) โดยสารพิษชนิด SEA ถึง SEI, SER, SES และ SET มักทำให้เกิดการอาเจียน (Vasconcelos & Cunha, 2010) การผลิตสารพิษจะเกิดตามหลังการเจริญของเชื้อไม่นานนัก ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพิษก็จะเป็นสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญด้วย (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษของ *S. aureus* แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของอาหารที่เกี่ยวข้อง แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 10-46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารพิษจะอยู่ในช่วง 34-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เจริญได้จะอยู่ในช่วง 4-10 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารพิษจะอยู่ในช่วง 7-8 (Schelin et al., 2011)

ตารางที่ 1 ชนิดของสารพิษที่ผลิตจาก *Staphylococcus* (Staphylococcal Enterotoxin; SEs) (ดัดแปลงจาก Schelin et al., 2011; Argudin et al., 2010)

Toxins	Molecular Weight (Da)	Genetic Backbone	Gene	Emetic Activity
SEA	27,100	Prophage	*sea*	yes
SEB	28,366	SaPI	*seb*	yes
SEC	27,517-27,618	SaPI	*sec*	yes
SED	26,360	Plasmid	*sed*	yes
SEE	26,425	Prophage	*see*	yes
SE/G	27,043	egc	*seg*	yes
SE/H	25,210	scc	*seh*	yes
SEI	24,298	egc	*sei*	weak
SE/J	28,565	Plasmid	*selj*	nd
SE/K	25,539	SaPI	*selk*	nd
SE/L	24,593	SaPI	*sell*	no*
SE/M	24,842	egc	*selm*	nd
SE/N	26,067	egc	*seln*	nd
SE/O	26,777	egc	*selo*	nd
SE/P	27,000	Prophage	*selp*	nd*
SE/Q	25,207	SaPI	*selq*	no
SER	27,049	Plasmid	*ser*	yes
SES	26,217	Plasmid	*ses*	yes
SET	22,614	Plasmid	*set*	weak
SE/U	27,100	egc	*selu*	nd
SE/V	-	egc	*selv*	nd

* Emetic activity demonstrate in rabbits or in small insectivore *Suncus murinus* but not in a primate model

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อ *S. aureus* เจริญได้ดี จะผลิตสารพิษปริมาณมาก มีรายงานว่าสารพิษจะผลิตได้ดีเมื่อมีปริมาณเซลล์มากกว่า 10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหาร (Bhatia & Zahoor, 2007) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใน 4-6 ชั่วโมง (Halpin & Marth, 1989) และ *S. aureus* มักจะสร้างสารพิษเมื่ออยู่ในช่วงระยะการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (Log phase / Exponential Phase) หรือ ช่วงตอนต้นของระยะพักตัว (Early Stationary Phase) (Argudin et al., 2010) แต่มีบางรายงานที่แสดงให้เห็นว่าสารพิษไม่ได้สร้างขึ้นในช่วงของการเจริญดังกล่าว (Schelin et al., 2011)

การลดอุณหภูมิในขณะที่เชื้อกำลังเจริญจะช่วยลดการสร้างสารพิษได้ ในอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แบคทีเรียสร้างสารพิษได้ภายใน 3 วัน แต่ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะสร้างสารพิษภายใน 12 ชั่วโมง และเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ระยะเวลาในการสร้างสารพิษจะนานขึ้น เช่น ที่ 15 องศาเซลเซียส พบสารพิษในวันที่ 4 และที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส พบสารพิษในวันที่ 8 หรือที่อุณหภูมิ 4-6.7 องศาเซลเซียส สามารถเก็บอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตรวจไม่พบสารพิษ การสร้างสารพิษของ *S. aureus* จะผลิตได้ดีเมื่อปราศจากแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นอาหารที่ได้ผ่านความร้อนมาแล้ว จำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่ำ และมีการปนเปื้อนของ *S. aureus* จึงเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและมีโอกาสสร้างสารพิษ (Robinson, Batt, & Patel, 2000) โดยสารพิษปริมาณเพียง 20-100 นาโนกรัม (ng) ที่ปนเปื้อนในอาหารทำให้มีอาการอาหารเป็นพิษแก่คนและสัตว์ได้ (Schelin et al., 2011) ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษเนื่องจาก *S. aureus* ได้สรุปและแสดงไว้ในตารางที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของ *Staphylococcus aureus* (ดัดแปลงจาก Schelin et al., 2011)

Factor	Growth		SEs production		SEs reported affected
	Optimum	Limits	Optimum	Limits	
Temperature (°C)	35-41	6-48	34-40	10-46	SEA, SEB, SEC, SED[1]
pH	6-7	4-10	7-8	5-9.6	SEA, SEB, SEC, SED, SEE[2]
a_w	0.99	0.83-≥0.99	0.99	0.86-≥0.99	SEA, SEB, SEC, SE*I*H[3]
NaCl (%)	0	0-20	0	< 12	SEA, SEB, SEC[4]
Oxygen	Aerobic	Anaerobic – Aerobic	Aerobic	Anaerobic – Aerobic	SEA, SEB, SEC, SE*I*H[5]
Eh	> +200 mv	< -200 mv – > +200 mv	> +200 mv	< -100 mv – > +200 mv	–

[1] Temperature seems to affect enterotoxin synthesis more that growth.

[2] Higher tolerance under aerobic compared with anaerobic growth conditions. Lactic acid particularly inhibits toxin formation.

[3] SEB and SEC may be more sensitive than SEA and SE*I*H .

[4] Raises temperature limit for SEA production. Low osmolality increases enterotoxin production. SEB production seems more strongly inhibited than growth.

[5] Increases yield of SEB up to 10-fold. 10% dissolved oxygen is optimal for SEB production.

3. การเกิดโรคและอาการของโรค

อาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Staphylococcus* มักเกิดขึ้นเสมอโดยมีสาเหตุจากสารพิษเอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ที่สร้างออกมาในอาหาร และเนื่องจากอาหารนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงพอ (60 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า) หรือเย็นไม่พอ (7.2 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า) เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก Staphyloccoci ทนร้อน ดังนั้นความร้อนจากการหุงต้มธรรมดาทั่วไป

ไม่สามารถทำลายความเป็นพิษได้ โดยปกติแล้วกระบวนการให้ความร้อนกับอาหารอาจจะฆ่าหรือทำลายเซลล์ของ *S. aureus* ได้แต่สารพิษยังคงอยู่ สารพิษนี้ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้เกิดการอักเสบ หรือที่เรียกว่า แกสโทรเอนเทอไรทิส (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

คำว่า Gastroenteritis หมายถึง อาการผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร คือมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย ถ่ายอุจจาระเหลวและบ่อย บางครั้งมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ และอาจมีไข้ร่วมด้วย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) โรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษของ *S. aureus* เรียกว่า แสตฟไฟโลคอคคอล อินทอกซิเคชัน (Staphylococcal Intoxication) (Schelin et al., 2011) เอนเทอโรทอกซินของ *S. aureus* ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ผู้บริโภคจึงไม่สามารถทราบได้ว่า มีสารพิษเกิดขึ้นในอาหาร (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) ซึ่งแต่ละบุคคลจะมีความไวต่อสารพิษได้แตกต่างกัน ดังนั้นกลุ่มคนที่บริโภคอาหารเป็นพิษชนิดเดียวกัน บางคนอาจมีอาการรุนแรง บางคนอาจมีอาการเล็กน้อย และบางคนอาจไม่มีอาการก็ได้ โดยทั่วไปในอาหารจะต้องมีแบคทีเรีย *S. aureus* อยู่มากกว่า 10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหาร แบคทีเรียจึงจะสร้างสารพิษได้มากพอที่จะทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ ระยะฟักตัวหลังจากการบริโภคอาหารจนเกิดอาการเป็นพิษ ใช้เวลาตั้งแต่ 1-6 ชั่วโมง (Bhatia & Zahoor, 2007) อาการป่วยที่มักพบคือ มีน้ำลายมาก เวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียนอย่างรุนแรง ปวดท้อง และท้องร่วง อาจมีมูกเลือดปนมาด้วย (Argudin et al., 2010) เนื่องจากสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อบุลำไส้และระบบทางเดินอาหาร (Bhatia & Zahoor, 2007) คนที่มีอาการป่วยรุนแรงมักมีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เหงื่อออก ตัวสั่น และร่างกายมีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ (Anonymous, 1992) อาการป่วยคงอยู่นาน 1-2 วัน ก็หาย (Argudin et al., 2010) ไม่จำเป็นต้องให้การรักษา การตายเนื่องจากอาหารเป็นพิษจากแสตฟไฟโลคอคคอล อินทอกซิเคชัน พบน้อยมาก แต่อาจเกิดขึ้นได้ หากผู้ที่เกิดการเจ็บป่วยเป็นผู้สูงอายุ เด็กทารก หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เหตุที่อาการของโรคเกิดจากสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นและขับออกมาในอาหาร จึงอาจตรวจไม่พบ *S. aureus* ในอุจจาระของผู้ป่วย การพิสูจน์เพื่อหาสาเหตุของโรคที่เชื่อถือได้มากที่สุด คือ การนำอาหารที่เหลือและอุจจาระของผู้ป่วยไปตรวจหาเอนเทอโรทอกซินแทนการตรวจหาเชื้อ (Vasconcelos & Cunha, 2010)

อาการของโรคในแต่ละคนค่อนข้างแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความไวต่อสารพิษของแต่ละบุคคล ปริมาณสารพิษในอาหารที่บริโภค และสุขภาพโดยรวมของผู้ติดเชื้อ นอกจากนี้ชนิดของสารพิษที่บริโภคยังมีผลต่อความรุนแรงของโรคด้วยเช่นกัน จากการทดสอบในอาสาสมัครพบว่าร้อยละ 46 ของอาสาสมัครที่สัมผัสสารพิษชนิด SEB มีอาการป่วยถึงขั้นรุนแรง ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล แต่อาสาสมัครที่ทดสอบสัมผัส SEA พบว่า เพียงร้อยละ 5 จากทั้งหมด

1,813 ราย ต้องการรับการบำบัดเท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสายพันธุ์ SEB สามารถสร้างสารพิษได้ในปริมาณที่มากกว่า SEA (Doyle et al., 1997; Vasconcelos & Cunha, 2010)

4. Infective Dose

จำนวน *S. aureus* ที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษนั้นไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นกับระดับความเข้มของเอนเทอโรทอกซิน และสภาวะแวดล้อมในอาหาร ตัวอย่างเช่น องค์ประกอบของอาหาร อุณหภูมิ สารเคมี รวมทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนอยู่ในอาหาร แต่จากรายงานขององค์การอาหารและยาและสหรัฐอเมริกา (FDA) รายงานว่า *S. aureus* จำนวนมากกว่า 10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหาร (CFU/g) ปนเปื้อนอยู่ในอาหารจึงจะสามารถสร้างสารพิษและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (Bhatia & Zahoor, 2007) แต่บางรายงานกล่าวว่าจำนวนเซลล์ต้องมีจำนวนมากถึง 10^5-10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหาร จึงจะสร้างสารพิษ แต่ในความเป็นจริงแล้ว บางครั้ง *S. aureus* ในปริมาณต่ำ สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพหรือเกิดอาการโรคได้ (Anonymous, 1992) ส่วน Ray and Bhunia (2008) อธิบายว่าการเกิดอาหารเป็นพิษจาก Staphylococci จะเกิดได้จากปริมาณ 30 กรัม หรือมิลลิลิตรของตัวอย่างอาหารที่มีสารพิษอยู่ 100-200 นาโนกรัม ที่ผลิตจากเชื้อ 10^6-10^7 เซลล์ต่อกรัม หรือเซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าสภาพแวดล้อมที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ (1) อาหารนั้นจะต้องมี *Staphylococcus* ชนิดที่ให้สารพิษอยู่ (2) อาหารชนิดนั้นจะต้องเหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษ (3) อุณหภูมิต้องเหมาะสมต่อการเจริญและมีระยะเวลานานพอต่อการผลิตสารพิษ (4) อาหารที่มีสารพิษนั้นถูกบริโภค (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

5. Toxin Dose

Staphylococci บางสายพันธุ์เมื่อเจริญในอาหารจะสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. aureus* ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 ชั่วโมง สารพิษจาก *Staphylococcus* มีสมบัติทำให้พลาสมาของเลือดแข็งตัวได้ (Coagulating Blood Plasma) (European Commission, 2003)

ในปี 1967 Bergdoll ได้ทดสอบความเป็นพิษของ เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตได้จาก Staphylococci ปริมาณ 5-20 ไมโครกรัมต่อสัตว์ โดยในลิงรีซัส (Rhesus) พบว่าเอนเทอโรทอกซินปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ลิงที่ใช้ทดสอบอาเจียน เมื่อทดสอบในสัตว์ต่างชนิดกัน คือ Pigtail Monkey (*Macaca nememtrina*) พบว่า ปริมาณต่ำสุดที่ทำให้สัตว์ทดลองชนิดนี้อาเจียน คือ 0.1 และ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในกรณีการระบาดของอาหารเป็นพิษในสหรัฐอเมริกา เนื่องจาก สารพิษเอนเทอโรทอกซิน เอ (SEA) 200 นาโนกรัม (2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) พบในนม

ช็อกโกแลตขนาด 400 มิลลิลิตร (Evenson, Hinds, Bernstein, & Bergdoll, 1988; Balaban & Rasooly, 2000)

ในปี 1969 Raj and Bergdoll ได้ทดสอบความเป็นพิษของเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก Staphylococci ในมนุษย์ โดยให้อาสาสมัครดื่ม เอนเทอโรทอกซิน บี (SEB) ที่บริสุทธิ์ปริมาณ 20-25 ไมโครกรัม หรือ 0.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว พบว่าปริมาณสารพิษดังกล่าวทำให้อาสาสมัครที่ทดสอบอาเจียน อาจกล่าวได้ว่า เอนเทอโรทอกซินจาก *Staphylococcus* 0.001 ไมโครกรัมต่อกรัมอาหารที่ปนเปื้อน ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ แต่ปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารโดยทั่วไปตรวจพบประมาณ 0.1-0.5 ไมโครกรัม (Robinson et al., 2000)

ในปี 1991 Notermans et al. ยังแสดงให้เห็นว่า เอนเทอโรทอกซิน เอ (SEA) เพียง 0.5 ไมโครกรัมทำให้เกิดการอาเจียนได้ ต่อมาในปี 1995 Mossel et al. ได้อธิบายว่า เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก Staphylococci 0.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะสามารถทำให้เกิดการอาเจียนได้ (European Commission, 2003)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหลายปัจจัยซึ่งทำให้ความรุนแรงของสารพิษแตกต่างกัน ได้แก่ ความไวต่อสารพิษแต่ละบุคคล ปริมาณอาหารที่บริโภค และสุขภาพโดยรวมของแต่ละบุคคล (Robinson et al., 2000) จึงสรุปได้ว่าสารพิษในปริมาณน้อยกว่า 0.1-1.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมที่ปนเปื้อนในอาหารสามารถก่อให้เกิดโรค แสตฟไฟโลคอคคอล อินทอกซิเคชัน และทำให้เกิดความเจ็บป่วยจากอาหารเป็นพิษในมนุษย์ได้ (International Commission on Microbiological Specification for Food [ICMSF], 1996)

6. การทำลาย *S. aureus* และ Staphylococcal Enterotoxin

S. aureus จะถูกทำลายได้ง่ายโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 83 นาที (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานขององค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA, 2001) ส่วนสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก Staphylococci นั้นทนความร้อนสูง มีรายงานสนับสนุนจาก Bhatia and Zahoor (2007) ว่า SEA ที่ปนอยู่ในเห็ดแม้จะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 28 นาที หรือ 127 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ยังคงมีคุณสมบัติทางชีววิทยาต่อความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (Balaban & Rasooly, 2000) ดังนั้นต้องให้ความร้อนมากกว่า 121 องศาเซลเซียส และใช้เวลามากกว่า 30 นาที ในการทำลายสารพิษ (European Commission, 2003) ยังมีรายงานว่า เอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก *Staphylococci* ทนต่อเอนไซม์ในกลุ่มโปรติโอไลติค (Proteolytic Enzyme) เช่น เปปซิน (Pepsin) (Balaban & Rasooly, 2000)

ดังนั้นการป้องกันโรค อาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Staphylococcus* สามารถป้องกันได้ โดย (1) ป้องกันการปนเปื้อนของอาหารจากเชื้อ *Staphylococcus* เช่น ประกอบอาหารอย่างถูกวิธี โดยใช้ความร้อนให้เพียงพอ การทำความสะอาดวัตถุดิบก่อนนำไปปรุง และควรตรวจสุขภาพคนปรุงอาหาร (2) ป้องกันการเจริญของ *Staphylococcus* เช่น อาหารที่ปรุงแล้ว หรือวัตถุดิบที่รอปรุง ควรเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อ และ (3) ทำลาย *Staphylococcus* ในอาหาร เช่น อาหารทั่วไปหรืออาหารกระป๋อง ควรทำให้ร้อนอีกครั้งหนึ่งก่อนนำมาบริโภค (บุษกร อุตรกิชาติ, 2545; สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549)

7. รายงานการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารเป็นปัญหาที่สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ ในแต่ละปีมีผู้เจ็บป่วยประมาณ 6-80 ล้านคน และตายมากกว่า 9,000 คน ซึ่งพบว่าโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ก็เป็นสาเหตุที่สำคัญและมักมีรายงานความเจ็บป่วย โดยมีรายงานว่าสารพิษที่ผลิตจาก *S. aureus* ชนิดเอนเทอโรทอกซิน เอ (SEA) เป็นสาเหตุอันดับแรกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีรายงานสูงถึงร้อยละ 77.8 ตามด้วย เอนเทอโรทอกซิน ดี และ บี (SED และ SEB) ร้อยละ 37.5 และ 10.0 ตามลำดับ (Balaban & Rasooly, 2000)

อาหารที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ในหลาย ๆ ชนิด มักเป็นอาหารที่ผ่านการสัมผัสด้วยมือแล้วไม่ผ่านการให้ความร้อนอีก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ไก่และผลิตภัณฑ์จากไข่ สลัด เช่น สลัดไข่ สลัดทูน่า สลัดไก่ ขนมสอดไส้ครีม ขนมเอแคลร์ช็อกโกแลต แซนวิชสอดไส้ มักกะโรนี ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเบอร์เกอร์ นมและผลิตภัณฑ์นม ครีมพาย เป็นต้น (Bhatia & Zahoor, 2007) ซึ่งอาหารที่เป็นสาเหตุนี้มักจะต้องการช่วงเวลาในการจัดจำหน่ายและขนส่ง ตลอดจนช่วงเวลาการเตรียม หลังจากเตรียมเสร็จแล้ว หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิขึ้น ๆ ลง ๆ ก็ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ (Anonymous, 1992)

ในสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1973-1987 พบว่าร้อยละของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นในอาหารประเภท เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อไก่และไก่งวง และกลุ่มผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ โดยมีสาเหตุสำคัญ 3 ประการคือ เก็บรักษาอาหารที่ปรุงแล้วไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม (ร้อยละ 51.6) การประกอบอาหารและผู้ประกอบอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (ร้อยละ 23.4) และปนเปื้อนมาจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบอาหาร (ร้อยละ 17.2) โดยการระบาดมักเกิดจะขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม (Ray & Bhunia, 2008)

การระบาดในรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่าเด็กประถมจาก 16 โรงเรียน จำนวน 1,364 คน จากจำนวนทั้งหมด 5,824 คน ป่วยหลังจากการบริโภคอาหารกลางวัน ซึ่งเตรียมจากครัวส่วนกลาง และขนส่งมายังโรงเรียนโดยรถบรรทุก จากการศึกษาทางระบาดวิทยา

พบว่าร้อยละ 95 ของเด็กที่ป่วย บริโภคสลัดไก่ ซึ่งสลัดไก่มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ คือ ในตอนเที่ยงวันของวันก่อนการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้นำไก่ซึ่งแช่แข็งไว้มาต้มประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นเลาะเอากระดูกออกและปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องด้วยพัดลม จากนั้นฉีกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เก็บไว้ในหม้ออลูมิเนียมที่มีความสูง 12 นิ้ว เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นแบบวอล์คอิน (Walk-In) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 42-45 องศาฟาเรนไฮต์ ($^{\circ}$F) ข้ามคืน เช้าวันต่อมา นำเครื่องปรุงสลัดที่เตรียมไว้มารวมกัน ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วจึงขนส่งไปยังโรงเรียนต่าง ๆ ในช่วงเช้าเวลา 9.30-10.30 น. อาหารจะวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเสิร์ฟในช่วงเวลา 11.30-12.00 น. จากการตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ตรวจพบ *S. aureus* ในปริมาณสูง การปนเปื้อนของ *S. aureus* ในไก่อาจจะเกิดในช่วงเลาะเอากระดูกออก เมื่อทำให้ไก่เย็นไม่เร็วพอ เนื่องจากไก่เก็บอยู่ในภาชนะที่สูงถึง 12 นิ้ว จึงเอื้ออำนวยให้มีการเจริญของ *S. aureus* ตลอดช่วงการเก็บรักษาไก่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง การป้องกันในกรณีนี้ คือ เลือกบุคคลที่จะเลาะกระดูกไก่ออกต้องไม่เป็นผู้ที่เป็นพาหะของ *S. aureus* ทำให้ไก่เย็นลงอย่างรวดเร็ว เก็บสลัดไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพียงพอจากช่วงการเตรียมถึงช่วงบริโภค จึงจะป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ได้ (Anonymous, 1992)

ในระหว่างปี ค.ศ. 1981-1995 ในประเทศเกาหลีพบการระบาดและการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษจาก *Staphylococcus* มากถึง 64 ครั้ง โดยมีผู้เจ็บป่วยทั้งหมด 2,430 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.5 ของการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารทั้งหมด ในช่วงระยะเวลาเดียวกันในประเทศญี่ปุ่นก็ประสบปัญหาเช่นเดียวกันแต่มีจำนวนน้อยกว่าโดยคิดเป็นร้อยละ 9.9 โดยพบว่าอาหารที่เป็นพาหะของการก่อโรค ได้แก่ผลิตภัณฑ์จากข้าวและข้าวปั้นซึ่งตรวจพบการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตจาก *Staphylococcus* ชนิด SEA และ SEB

ในปี ค.ศ. 1997 พบการเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษในรัฐฟอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา มีสาเหตุมาจากการบริโภคแฮมที่มีสารพิษจาก *S. aureus* ซึ่งพบผู้เจ็บป่วยจำนวน 35 คน จาก 125 คนที่มาร่วมงานปาร์ตี้ โดยมีอาการเจ็บป่วย คือ คลื่นไส้ร้อยละ 94 อาเจียนร้อยละ 89 ถ่ายอุจาระร้อยละ 72 หนาวสั่นร้อยละ 44 ปวดหัวและมีไข้ร้อยละ 11 ซึ่งอาการเหล่านี้เกิดขึ้นภายใน 3-6 ชั่วโมงหลังจากบริโภคแฮม ผู้ป่วย 7 คนต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล ในจำนวนนี้มี 2 รายที่ต้องพักรักษาตัวต่อ (CDC, 1997c)

เดือนมิถุนายนปี ค.ศ. 2000 วันที่ 30 มีรายงานว่าชาวญี่ปุ่นเจ็บป่วยจากการดื่มนม 1,152 ราย มีอาการคลื่นไส้ อาเจียนและอุจาระร่วง และในวันที่ 6 กรกฎาคม ค.ศ. 2000 ผู้เจ็บป่วยเพิ่มสูงขึ้นเป็น 10,780 ราย จนถึงวันที่ 11 กรกฎาคม ปีเดียวกัน เพิ่มขึ้นอีก 14,000 ราย รวมเป็น 14,555 ราย จากการตรวจสอบของห้องปฏิบัติการพบว่า นมของบริษัท SNOW BRAND FOOD

ซึ่งเป็นผู้ผลิตอุตสาหกรรมนมรายใหญ่ของญี่ปุ่น มีการปนเปื้อนของ *S. aureus* และตรวจพบการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซินชนิด SEA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยรับสารพิษชนิดนี้โดยเฉลี่ยต่อคนประมาณ 20-100 นาโนกรัม โดยมีสาเหตุมาจากสุขลักษณะของเจ้าหน้าที่ผลิตนมที่ไม่ดี (Food Doctors, 2008)

ในประเทศอิตาลี ได้ทำการศึกษาข้อมูลในช่วงปี 2000-2002 โดยเก็บตัวอย่างอาหารในร้านค้าปลีก จำนวน 9,869 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 19.7 ของตัวอย่างตรวจพบ *S. aureus* และในจำนวนนี้พบว่าร้อยละ 23.1 และ 20.7 เป็นอาหารในกลุ่มเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ชีส ตามลำดับ ตรวจพบผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ร้อยละ 3.5 พาสต้า ร้อยละ 7.6 และผลิตภัณฑ์จากนมร้อยละ 6.4 (Giannatale, Prencipe, Tonelli, Marfoglia, & Migliorati, 2011)

จากรายงานของ Centers for Disease Control and Prevention; CDC สรุปการตรวจพบการระบาดของ *S. aureus* และสารพิษในประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003-2010 พบว่าในปี ค.ศ. 2003-2007 มีการระบาด 35 ครั้ง และมีผู้ป่วย 472 ราย คิดเป็นร้อยละ 2 ของการเจ็บป่วย ปี ค.ศ. 2008 มีการระบาด 14 ครั้ง และมีผู้ป่วย 311 ราย คิดเป็นร้อยละ 2 ปี ค.ศ. 2009 และ 2010 พบการระบาด 11 และ 8 ครั้ง และมีผู้ป่วย 124 และ 128 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.5 ทั้งสองปี ซึ่งเห็นได้ว่าการระบาดค่อย ๆ ลดลงเรื่อย ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษจาก Staphylococci ในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2003-2010
(ดัดแปลงจาก CDC, 2011a; CDC, 2013)

Years	Outbreaks		Illnesses	
	Total No.	%	Total No.	%
2003-2007	35	5	472	2
2008	14	2	311	2
2009	11	1.2	124	0.5
2010	8	0.8	128	0.5

สำหรับในประเทศไทยพบว่าการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษจาก *S. aureus* เกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง โดยเฉพาะอาหารที่ต้องใช้มือสัมผัสในการประกอบและไม่มีการให้ความร้อนหรือให้ความร้อนไม่เพียงพอ เช่น ข้าวปั้นญี่ปุ่น ขนมเครปที่ใส่ไส้ต่าง ๆ ขนมโตเกียว

เป็นต้น แต่ไม่ค่อยมีการรายงานความเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลอย่างแน่ชัด เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่มักเป็นและหายเองได้ในเวลาไม่นาน แต่ที่ผ่านมามีตัวอย่างการรายงานความเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นในจังหวัดสิงห์บุรี โดยพบว่ามีผู้ป่วยอาหารเป็นพิษจากการบริโภคขนมโตเกียวและเครปจำนวน 7 ราย สาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดครั้งนี้ พบว่าผู้ป่วยได้รับขนมโตเกียวและเครปจากรถเร่ที่เข้ามาขายในหมู่บ้านและโรงเรียน จากการสอบสวนผู้ที่ซื้อขนมโตเกียวและเครปจากรถเร่ร้านนี้บางรายบริโภคไส้หวาน บางรายบริโภคไส้พริกเผา ไส้ฮอกดอกและไส้หมูหยอง โดยผู้ที่ป่วยเป็นโรคอาหารเป็นพิษได้บริโภคเครปไส้ฮอดดอกและหมูหยองเหมือนกัน และจากการเก็บตัวอย่างอาหารส่งตรวจเพื่อหาเชื้อโรค ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบเชื้อ *S. aureus* ในฮอดดอกและหมูหยอง และประกอบกับสุขลักษณะส่วนตัวของผู้ขายไม่ดีพอ เช่น ในช่วงที่พักการขายไม่ได้เก็บอาหารสดไว้ในความเย็น และมีผ้าเช็ดมือเป็นผ้าที่มีคราบสกปรกติดอยู่จำนวนผืนเดียว จึงทำให้เกิดการเพาะเชื้อโรคขึ้นได้ และเป็นสาเหตุของการระบาดในครั้งนี้ (สิลินทิพย์ ชัยบุรินทร์ และคณะ, ม.ป.ป.)

สุดสายชล หอมทอง, อัญธิกา พูลทรัพย์, จุฑามาศ สุขศรี และอาพวี ขำทอง (2555) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของ *S. aureus* ในเนื้อไก่ดิบปรุงรสโดยวิธี Direct Plate Count จำนวน 60 ตัวอย่าง สุ่มตัวอย่างมาจากร้านค้าที่วางจำหน่ายบริเวณใกล้มหาวิทยาลัยบูรพาและชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่างเนื้อไก่ดิบปรุงรสมีค่ามากกว่า 10 CFU/g จำนวน 24 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 40) โดยพบอยู่ในช่วง $2.50x10^2$-$3.88x10^3$ CFU/g ซึ่งทั้งหมดมีค่ามากกว่าเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ในปี พ.ศ. 2553-2554 สุดสายชล หอมทอง, นพวัฒน์ ภูคำ, วาทิณี พิทักษ์พงศ์, ฐิติพรรณ บางบำรุง และณัฐาพร เกตุรัตนาลี (2554) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของ *S. aureus* ในตัวอย่างผลไม้พร้อมบริโภคคือ มะม่วง แตงโม ฝรั่ง องุ่น แคนตาลูป มะละกอ แก้วมังกร และองุ่นที่สุ่มตัวอย่างมาจากร้านค้าที่วางจำหน่ายใกล้มหาวิทยาลัยบูรพา และในห้างสรรพสินค้า บริเวณอำเภอเมืองชลบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 โดยสุ่มตัวอย่างมาทั้งหมด 84 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Direct Plate Count ผลการศึกษาพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในตัวอย่างผลไม้ 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) ซึ่งมี 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.95) มีค่ามากกว่าเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าผลไม้ตัดแต่งมีความเสี่ยงที่สูงต่อการเกิดโรคติดต่อทางอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีการดำเนินการที่ดีในเรื่องสุขอนามัยของอาหารเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของผลไม้พร้อมบริโภค

Salmonella spp.

1. ลักษณะทั่วไปและการจัดจำแนกของ *Salmonella* spp.

1.1 ลักษณะทั่วไป

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae มีรูปร่างท่อนขนาด 0.4-0.6 x 2-3 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous Flagella) เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative Anaerobe) (Pui et al., 2011) ใช้ซิเตรท (Citrate) เป็นแหล่งพลังงาน ส่วนใหญ่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) และไม่ไฮโดรไลส์ยูเรีย (Urea) (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549) สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่ไม่ย่อยแล็กโทส (Lactose) หรือซูโครส (Sucrose) (Somyanontanagul, Nathues, Tegeler, & Blaha, 2008) เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5-47 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35-37 องศาเซลเซียส (Pui et al., 2011) แต่ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้บ่มเพาะเชื้อในขั้นคัดแยกและส่งเสริมการเจริญ (Selective Enrichment) เพราะที่อุณหภูมินี้ *Salmonella* เจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ดีกว่า (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6.5-7.5 ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วง 4.5-9.5 ค่า a_w ที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 0.945-0.999 (Somyanontanagul et al., 2008) *Salmonella* spp. ไม่ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ แต่ก็สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 0.4-4.0 (Pui et al., 2011)

1.2 การจัดจำแนก

ในปัจจุบันการจำแนก *Salmonella* อาศัยชนิดของซีโรวาร์ (Serovars) หรือซีโรไทป์ (Serotype) ซึ่งพบว่ามีมากกว่า 2500 ซีโรวาร์ (Freitas Neto, Penha Filo, Barrow, & Berchieri Junior, 2010; Somyanontanagul et al., 2008) โดยได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองวิทยา (Serology) คือปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่ผิว (Somatic Cells หรือ O-Antigen) ที่แฟลกเจลลา (Flagellar Cells หรือ H-Antigen) และที่แคปซูล (Capsular หรือ K-Antigen) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันเป็นตัวกำหนดสปีชีส์ และมีการใช้เทคนิคอื่น เช่น DNA-DNA Hybridization และ Multilocus Enzyme Electrophoesis; MEE ร่วมด้วย (Pui et al., 2011; สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ทำให้ *Salmonella* ทั้งหมดถูกนำมาจัดกลุ่มเป็น 2 สปีชีส์ คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* ซึ่งสปีชีส์ *enterica* สามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยอีก 6 สับสปีชีส์ (Subspecies) ประกอบด้วย *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) และ *indica* (VI) (Somyanontanagul et al., 2008) โดยในแต่ละสปีชีส์จะมีจำนวน

ซีโรวาร์แตกต่างกันไป ซึ่งพบว่าในสับสปีชีส์ *enterica* มีสมาชิกมากถึง 1490 ซีโรวาร์ (Freitas Neto et al., 2010) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ซีโรวาร์ สปีชีส์และสับสปีชีส์ของ *Salmonella*

(ดัดแปลงจาก Pui et al., 2011; Freitas Neto et al., 2010)

Species	*S. enterica*						*S.*
Subspecies	*enterica*	*salamae*	*arizonae*	*diarizonae*	*houtenae*	*indica*	*bongori*
Classification Number	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Number of Serovars	1490	500	94	329	72	12	22

จากการจัดจำแนกนี้ทำให้มีการเรียกชื่อแบบสามัญโดยให้ระบุชื่อเต็มทั้ง สปีชีส์และสับสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ส่วนการเรียกชื่อซีโรวาร์ให้เขียนชื่อ จีนัส (Genus) โดยใช้ตัวเอนและชื่อ ซีโรวาร์ ให้ใช้ตัวธรรมดา และตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น *Salmonella enterica serova* Typhimurium (หรือเขียนย่อว่า *Salmonella* Typhimurium; *S.* Typhimurium) แต่ก็ยังมีรายงานอีกหลายฉบับที่ใช้การเขียนแบบชื่อวิทยาศาสตร์ปกติเช่นเดียวกับเชื้ออื่น ๆ เช่น *Salmonella typhimurium* (Ray & Bhunia, 2008; สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ชื่อของ *Salmonella* เป็นข้อตกลงระหว่างประเทศ โดย ซีโรวาร์ที่บ่งถึงสปีชีส์มักถูกตั้งขึ้นตามสถานที่ที่แยกเชื้อนั้นได้เป็นครั้งแรก เช่น *S.* London, *S.* Miami, *S.* Richmond, *S.* Bangkok, *S.* Muenchen และ *S.* Rachaburi เป็นต้น ก่อนหน้านี้ ได้มีการตั้งชื่อเชื้อ *Salmonella* หลายแบบ เช่น *S.* Typhimurium ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ในหนูทดลอง (Somyanontanagul et al., 2008)

ในทางระบาดวิทยา จำแนกเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

(1) *Salmonella* ที่อาศัยคนเป็นโฮสต์เพียงอย่างเดียว ประกอบด้วย *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi C เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์และไข้รากสาดน้อย จัดเป็น *Salmonella* ที่มีความรุนแรงมากที่สุด และมีอัตราการตายสูงสุด สามารถแยก *S.* Typhi ได้จากเลือด อุจจาระ และ/หรือปัสสาวะของผู้ป่วยได้ก่อนและหลังอาการไข้ขึ้นสูง ส่วนไข้รากสาดน้อยมีอาการรุนแรงน้อยกว่าไข้ไทฟอยด์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(2) *Salmonella* ที่ปรับตัวตามโฮสต์ (สามารถทำให้เกิดโรคกับคนโดยผ่านทางอาหาร) ประกอบด้วย *S.* Dublin อาศัยวัวเป็นโฮสต์ *S.* Abortus-equi อาศัยม้าเป็นโฮสต์ *S* Abotus-ovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ และ *S.* Choleraesuis อาศัยห่านเป็นเป็นโฮสต์ประจำ

(3) *Salmonella* ที่ไม่จำกัดโฮสต์ ได้แก่ *Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ ประกอบด้วย *Salmonella* ที่เหลือทั้งหมดซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซัลโมเนโลซิส (Salmonellosis) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

1.3 แหล่งที่พบ

สามารถตรวจพบ *Salmonella* ได้ทั่วไปในธรรมชาติ และทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยมีคนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยปฐมภูมิตามธรรมชาติ (Primary Habitat) โดยมักพบอยู่ในลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลงในสัตว์ต่าง ๆ และนกหลาย ๆ ชนิด พบว่าสามารถเจ็บป่วยด้วยโรคซัลโมเนโลซิส และยังเป็นพาหะในการนำเชื้อโรคอีกด้วย มนุษย์เองก็สามารถเป็นพาหะในการนำโรคและการแพร่กระจายของเชื้อได้เป็นระยะเวลานานโดยผ่านทางอุจจาระ แบคทีเรียจะออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจายไปเข้าสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วนเวียนเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหารสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักร การขนส่งสัตว์ และอาหารระหว่างประเทศทำให้เชื้อกระจายไปทั่วโลก การแพร่กระจายของ *Salmonella* และการเกิดโรคอาหารเป็นพิษมักเกิดเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน (Somyanontanagul et al., 2008; Ray & Bhunia, 2008) สามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากดิน น้ำ และกากตะกอนของเสีย

เนื่องจากคนสามารถเป็นพาหะในการแพร่กระจายของ *Salmonella* ได้ จึงตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากอุจจาระของคนเป็นจำนวนมากและมีแนวโน้มของผู้ที่เป็นพาหะเพิ่มสูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2544 พบผู้เป็นพาหะของ *Salmonella* เฉลี่ยร้อยละ 8.88 โรงงานที่มีพนักงานเป็นพาหะสูงสุด คือ ร้อยละ 15.38 และต่ำสุด ร้อยละ 3.78 นอกจากนี้ ได้มีการตรวจติดตามผู้เป็นพาหะทุกเดือนหรือทุกสองเดือนในโรงงานผลิตอาหารแช่เยือกแข็ง 3 แห่ง จำนวน 16,624 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2544 ปรากฏว่าอัตราของผู้เป็นพาหะของ *Salmonella* สูงสุดในหน้าร้อน (เดือนมีนาคม-เดือนพฤษภาคม) และต่ำสุดในหน้าฝน (เดือนสิงหาคม-เดือนกันยายน) (อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และสุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

อาหารที่มักพบเป็นสาเหตุของโรคซัลโมเนโลซิส นั้นมีมากมายหลายชนิดและมักเป็นอาหารที่มาจากสัตว์โดยเฉพาะสัตว์ปีก ยิ่งถ้าทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน เช่น เนื้อสด ไข่ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์นมมักปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ สำหรับอาหารชนิดอื่นที่อาจพบ *Salmonella* ได้แก่ ไอศกรีม อาหารที่มีไข่เป็นส่วนผสม สลัด แซนวิชผักและผลไม้ เนื้อสด

อาจมี *Salmonella* ปนเปื้อนมาในขณะชำแหละ และเมื่อแปรรูปทำให้ปนเปื้อนไปในผลิตภัณฑ์ได้ เช่น ไส้กรอก แฮม เบคอน ที่ปล่อยทิ้งไว้อุณหภูมิห้องจะทำให้เชื้อเจริญและเพิ่มจำนวนได้ดี (สุรีย์ นานาสมบัติ. 2549; สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

2. การเกิดโรคและอาการของโรค

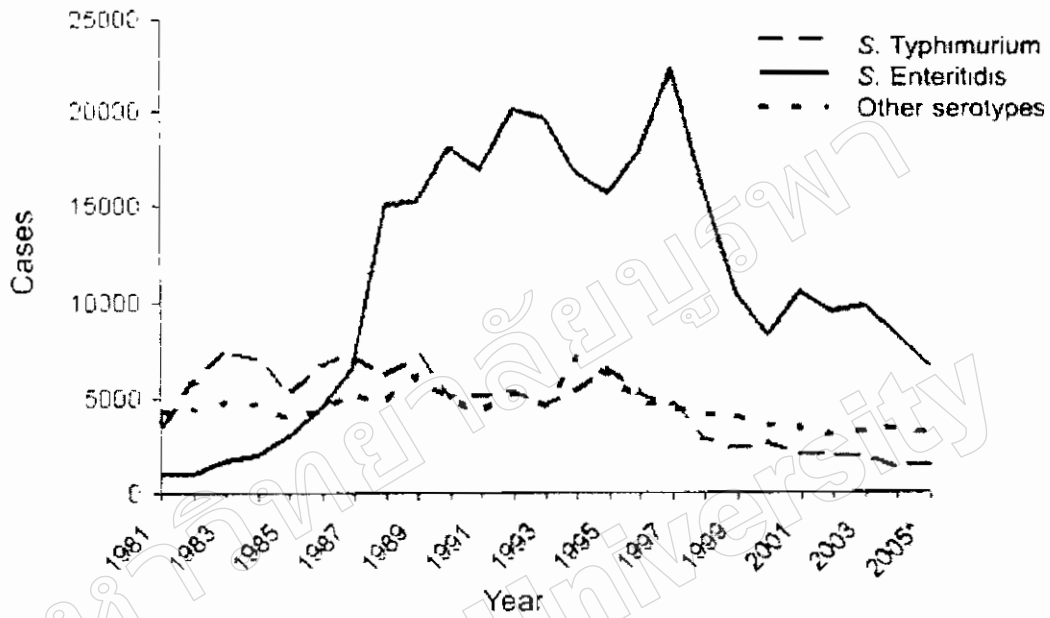
โรคซัลโมเนโลซิส เป็นโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* เข้าไปในร่างกาย เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุดในบรรดาโรคติดเชื้อจากอาหารทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีอีก 2 โรค ที่มีสาเหตุมาจากการบริโภค *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi A เข้าไป ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์ และไข้พาราไทฟอยด์ (Coburn, Grassl. & Finlay. 2007; Pui et al., 2011) โรคซัลโมเนโลซิส จะมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 12-36 ชั่วโมง เกิดจากการที่ *Salmonella* ในลำไส้ผ่านเข้าไปในเซลล์เยื่อบุของลำไส้เล็ก (Epithelium Cells) ซึ่งทำให้เกิดบาดแผล และ *Salmonella* ยังสร้างเอนเทอโรทอกซินที่ทำให้เกิดความเป็นพิษในลำไส้ (Pongsricharoensook. 2001) อาการสำคัญของโรค คือ คลื่นไส้อาเจียน ปวดท้องและท้องเสีย อาจปวดท้องหรือหนาวสั่น นอกจากนี้อุจจาระเป็นน้ำ มีสีเขียวอ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง ง่วง อัตราการตายต่ำกว่าร้อยละ 1 ส่วนใหญ่จะมีอาการอยู่ 2-3 วัน ก็จะดีขึ้นแต่ยังคงต้องพักผ่อนต่อไปอีก ผู้ป่วยที่หายแล้วมีโอกาสเป็นพาหะของโรคได้ถึงร้อยละ 0.2-5 (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

การเจริญของ *Salmonella* ในอาหารมักไม่ทำให้ลักษณะของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ไม่ว่าจะเป็นกลิ่นหรือรส ดังนั้นถ้ามีแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้อยู่ในอาหารมากเท่าใดก็จะทำให้ผู้บริโภคเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้มากขึ้นและมีระยะฟักตัวเร็วขึ้น (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) โดยทั่วไปพบว่า *Salmonella* ที่มักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยด้วยโรคซัลโมเนโลซิส คือ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* โดยพบว่ามีอยู่ 2 ซีโรไทป์ ที่มักมีรายงานความเจ็บป่วย ได้แก่ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ดังแสดงในภาพที่ 1 (Ray & Bhunia, 2008)

จากรายงานการเกิดโรคระบาดของ CDC ในประเทศสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 1997 ที่แสดงถึงการระบาดของโรคซัลโมเนโลซิส ที่มีสาเหตุมาจากวัตถุดิบและการผลิตอาหาร ตัวอย่างเช่น ความเจ็บป่วยที่เกิดในรัฐมินนีโซต้า (Minnesota) จากการบริโภคผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่มีมากถึง 224,000 ราย พบว่าเกิดจากพาหะชนิดใหม่ที่สามารถนำ *Salmonella* ได้ คือ เปลือกไข่ที่เป็นส่วนผสมหรือวัตถุดิบหลักที่สำคัญในการผลิตไอศกรีม โดยพบว่าเชื้อ *Salmonella* นั้นอยู่ในลำไส้ของไก่ และเมื่อไก่ออกไข่จึงมีเชื้อติดมาที่เปลือก เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะแห้งแล้ง เมื่อนำไข่มาประกอบอาหาร อาจสัมผัสกับมือของผู้ประกอบหรือมีการปนเปื้อนของเปลือกไข่ลงไปในส่วนประกอบ จึงเป็นสาเหตุของการระบาดและการแพร่กระจายของ

เข้าถึงเอกสารฉบับเต็มได้ที่
คลังปัญญาจุฬาฯ

โรคซัลโมเนโลซิส นั่นเอง (Wallace, Russell, John, & Bailey, 2006) ซึ่งในช่วงปี ค.ศ. 1970-2000 พบว่าการเจ็บป่วยด้วยโรคซัลโมเนโลซิสมีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นเรื่อย ๆ (Jay et al., 2005)



ภาพที่ 1 สปีชีส์ของ *Salmonella* ที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยด้วยอาหารเป็นพิษ ในประเทศอังกฤษและเวลส์ ปี ค.ศ. 1981-2005 (Ray & Bhunia, 2008)

3. Infective Dose

การจะเป็นโรคติดเชื้อจาก *Salmonella* นั้นขึ้นอยู่กับความต้านทานโรครวมถึงอายุของผู้บริโภค ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *Salmonella* ชนิดและสายพันธ์ของเชื้อและจำนวนเชื้อที่ถูกบริโภคเข้าไป (Pui et al., 2011) เช่น *S.* Pullorum จะต้องถูกบริโภคเข้าไป 10^8-10^{12} เซลล์ จึงจะทำให้เกิดโรคขึ้น เมื่อเทียบกับ *S.* Enteritidis ที่ถูกบริโภคเข้าไปเพียง 10^6 เซลล์ก็ทำให้เกิดโรคได้แล้ว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) โดยทั่วไปพบว่าปริมาณเชื้อตั้งแต่ 1-10^9 เซลล์ ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานแจ้งว่า *Salmonella* เพียง 1-10 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดอาการรุนแรงได้ ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อ อายุ และสุขภาพของผู้ป่วยเป็นสำคัญนั่นเอง (Pui et al., 2011) โดยอาการของโรคจะเกิดขึ้นภายใน 6-72 ชั่วโมง (Coburn et al., 2007) และยังคงมีอาการต่ออีกในระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน หรือนานกว่านั้น (2-7 วัน) (Pongsricharoensook, 2001; Forsythe, 2002)

328809

4. การทำลาย *Salmonella* spp.

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อการให้ความร้อน โดยทั่วไปสามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อ *Salmonella* ได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า (Pui et al., 2011) มีรายงานว่าการพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 12 นาที (มีค่า $D_{60°C}$ เท่ากับ 0.06 -11.3) ก็สามารถกำจัด *Salmonella* ให้หมดไปได้ แบคทีเรียชนิดนี้อ่อนแอต่อสภาวะกรด (พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.5) และไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อมีค่า a_w เท่ากับ 0.94 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่จะกำจัดหรือยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* คือ มีอุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชต่ำกว่า 3.8 และมีค่า a_w น้อยกว่า 0.94 (Pui et al., 2011; Ray & Bhunia, 2008)

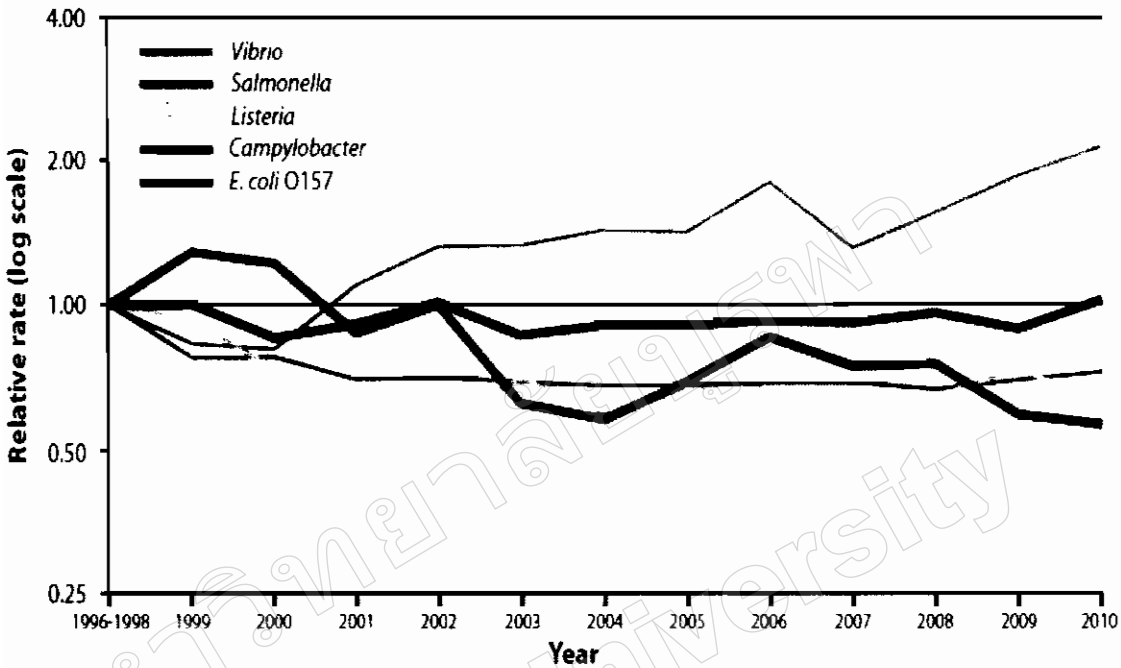
เนื่องจากทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยระดับปฐมภูมิของ *Salmonella* จึงกล่าวได้ว่าอุจจาระของมนุษย์และสัตว์อาจมี *Salmonella* ด้วย แต่ในอุจจาระของสัตว์มีโอกาสพบ *Salmonella* ได้มากกว่าในอุจจาระของมนุษย์ เพราะสัตว์กินอาหารไม่เลือก อีกทั้งอาหารสัตว์ก็มีโอกาสปนเปื้อนได้มากกว่าอาหารของมนุษย์ ตามร่างกายและสิ่งปกปิดใต้ขน ข้อพับของสัตว์อาจมี *Salmonella* ด้วย แหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ของ *Salmonella* ไปยังเนื้อสัตว์ชำแหละ คือ สัตว์เป็นพาหะ และอาหารสัตว์ การปนเปื้อนในลำดับต่อมา คือ ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสกับอาหาร ยิ่งถ้าผู้ทำหน้าที่ที่ต้องสัมผัสอาหารเป็นพาหะของ *Salmonella* ด้วยแล้ว ความเสี่ยงของผู้บริโภคก็จะยิ่งสูงขึ้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

5. รายงานการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารถือเป็นปัญหาที่สำคัญระดับโลก ซึ่งมีแนวโน้มการรายงานความเจ็บป่วยสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996-2010 CDC ได้รายงานว่าแนวโน้มของความเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่เกิดจาก *Salmonella* ในปี ค.ศ. 2010 สูงกว่าในช่วงปี ค.ศ. 1996-1998 อยู่ร้อยละ 3 ของจำนวนทั้งหมด ซึ่งสูงขึ้นเป็นอันดับสองรองจาก *Vibrio* spp. (CDC, 2011b) ดังแสดงในภาพที่ 2

อาหารที่มาจากผลิตภัณฑ์สัตว์เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของ *Salmonella* ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่ทำจาก เนื้อวัว เนื้อไก่และไก่งวง เนื้อหมู นมและผลิตภัณฑ์จากนม ไข่ นอกจากนั้นยังมีผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีก (ตามตารางที่ 8) ซึ่งอาหารเหล่านี้จะถูกปนเปื้อนจาก *Salmonella* ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม จากอุจจาระของพาหะนำโรค (คน นก และสัตว์อื่น ๆ) เช่น ปนเปื้อนจากวัตถุดิบ หรือในระหว่างการเตรียม และให้ความร้อนไม่พอ หรือเกิดการปนเปื้อนข้ามในระหว่างการขนส่ง สามารถแยก *Salmonella* ได้จากอาหารหลายชนิดที่มีพืชเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากการเพาะปลูกมีการใช้ตะกอนดินหรือปุ๋ยในการเพาะปลูก หรือใช้น้ำบาดาลในการรดน้ำ

ทำให้มีการปนเปื้อนไปในพืชผักหรือผลไม้ก่อนนำไปประกอบอาหาร เช่น แคนตาลูป มะเขือเทศ และถั่ว เป็นต้น (Ray & Bhunia, 2008)



ภาพที่ 2 รายงานความเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996-2010 (CDC, 2011b)

ในปี 1985 มีรายงานการระบาดของ *Salmonella* ถึง 16,000 ครั้ง ใน 6 รัฐของสหรัฐอเมริกา เนื่องมาจากการบริโภคนมสดและนมสดขาดมันเนยจากโรงงานนมในชิคาโก ซึ่งถือว่าเป็นการระบาดของ *Salmonella* ครั้งที่รุนแรงที่สุดที่เกิดขึ้นในสหรัฐอเมริกา โดยองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (United State Food and Drug Administration; USFDA) พบว่าการระบาดเกิดจากผู้ประกอบการได้ดัดแปลงเครื่องมือที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ทำให้นมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเข้าไปผสมกับน้ำนมดิบ ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในปีเดียวกันช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน พบการระบาดของ *S.* Enteritidis ในพนักงานและลูกค้าของร้านอาหาร 3 แห่ง ในรัฐแมรี่แลนด์ (Maryland) สหรัฐอเมริกา โดยในร้านอาหารแห่งหนึ่ง มีผู้ป่วยจาก *S.* Enteritidis ถึง 71 ราย และ 17 รายต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล ซึ่งการระบาดในร้านอาหารทั้ง 3 แห่ง เกิดจากการบริโภคไข่กวน (Scrambled Eggs) และเมื่อตรวจเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยทั้งหมดปรากฏว่า

เป็น *Salmonella* และจากสถิติของ CDC พบว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิตจาก *S.* Enteritidis มากกว่า 120 ราย ซึ่งมีทั้งที่เกิดในร้านอาหาร บ้าน โรงพยาบาล และห้องขัง

ในปี ค.ศ. 1986 มีรายงานว่าการระบาดของ *S.* Enteritidis จำนวน 186 ครั้ง บนสายการบิน 29 สายในสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีผู้โดยสารประมาณ 2,747 ราย ป่วยแต่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าเกิดจากอาหารประเภทใด ได้เบาะแสเพียงว่าอาหารที่เสิร์ฟในสายการบินชั้น 1 เป็นรายการที่มีความเสี่ยงในการเกิดโรคมากที่สุด ซึ่ง CDC ประมาณว่าร้อยละ 75 ของการระบาดเกิดจากการบริโภคไข่สด หรือไข่ที่ปรุงสุกไม่เต็มที่ ดังนั้นในวันที่ 16 กุมภาพันธ์ ค.ศ. 1990 กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา จึงได้ออกกฎระเบียบเกี่ยวกับการตรวจสอบลูกไก่ ไข่ ทั้งที่เป็นประเภท ไก่ไข่ และไก่เนื้อ ซึ่งกฎระเบียบนี้ทำให้การระบาดของ *Salmonella* จากการบริโภคไข่สดลดลง (Pongsricharoensook, 2001)

ในปี ค.ศ. 1989 มีรายงานการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในอาหารสัตว์ร้อยละ 49 โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้สำรวจอาหารสัตว์จากผู้บรรจุและผู้จัดส่งอาหาร พบอัตราการปนเปื้อนของ *Salmonella* ร้อยละ 20-25 แต่ในอาหารสัตว์อัดเม็ดพบอัตราการปนเปื้อนเพียงร้อยละ 6 (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ปี ค.ศ. 1993-2001 พบว่าอาหารที่ซื้อจากร้านค้าปลีกในประเทศเกาหลี จำนวน 1,334 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Salmonella* ร้อยละ 2.2 โดยพบมากที่สุดคือ *S.* Enteritidis

ปี ค.ศ. 1996-1997 ตรวจพบ *Salmonella* ร้อยละ 6.3 จากเนื้อวัว และเนื้อหมูในประเทศเยอรมัน 1,445 ตัวอย่าง และซีโรวาร์ที่พบมากที่สุด คือ *S.* Typhimurium และ *S.* Derby

ปี ค.ศ. 1998 มีการตรวจพบ *Salmonella* ในอาหารและเครื่องดื่มของประเทศสิงคโปร์ ซึ่งถือว่าเป็นประเทศที่พัฒนาแล้วในระบบอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร โดยตรวจพบร้อยละ 1.4 จากตัวอย่างอาหาร 2,617 ตัวอย่าง ซึ่งซีโรวาร์ที่พบมากที่สุด คือ *S.* Typhimurium, *S.* Agona และ *S.* Enteritidis ตามลำดับ ส่วนในประเทศญี่ปุ่น ในช่วงปี ค.ศ. 1993-1998 จากอาหารไก่ 10,418 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Salmonella* ร้อยละ 0.5 ซึ่งพบว่าส่วนมากเป็น *S.* Eastbourne และ *S.* Orion (Jay et al., 2005)

ในประเทศเดนมาร์ก เดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ปี ค.ศ. 2005 พบการระบาดของโรคซัลโมเนโลซิส โดยมีสาเหตุมาจาก *S.* Typhimurium DT104 ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อวัวที่นำเข้า และในปีเดียวกันยังพบการระบาดในประเทศฝรั่งเศษ โดยพบว่ามีการปนเปื้อนของ *S.* Agona ในนมผงสำหรับทารก ทำให้มีทารกเจ็บป่วยมากกว่า 100 ราย (Freitas Neto et al., 2010)

CDC ได้รายงานการระบาดของ *Salmonella* ในประเทศสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2010 ในช่วงวันที่ 28 เมษายน พบผู้ป่วยจำนวน 272 รายซึ่งมีสาเหตุมาจาก *S.* Montevideo ที่ปนเปื้อนใน

Salami ที่มีการเรียกคืนจากผู้ผลิตก่อนหน้านั้น 2 สัปดาห์ (CDC, 2010) และในปีเดียวกันนี้ยังพบการรายงานความเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* ปนเปื้อนอีกหลายราย ได้แก่ *S.* Enteritidis จากผู้ป่วยที่บริโภคไข่ดิบ 37 ราย ในเมืองเกล็นโซ (Glencoe) พบ *S.* Newport จากการบริโภค Alfalfa Sprouts ดิบ จากผู้ป่วย 44 ราย พบ *S.* Hvittingfoss จากการบริโภคอาหารในร้าน Subway ในเมืองอิลลินอยส์ (Illinois) ทำให้มีผู้ป่วยประมาณ 100 คน (Falkenstein, 2010) เป็นต้น

การรายงานล่าสุดของ CDC ในเดือนมีนาคม ค.ศ. 2013 พบการระบาดของ *S.* Typhimurium ในเนื้อบดซึ่งผลิตจากบริษัทในเมืองมิชิแกน (Michigan) ทำให้มีผู้ป่วยจำนวน 22 ราย จาก 6 รัฐ และร้อยละ 50 ของผู้ป่วยต้องรักษาตัวในโรงพยาบาล ผู้ป่วยมีอาการท้องร่วง มีไข้ และปวดท้องหลังจากบริโภคอาหารไป 12-72 ชั่วโมง (Herriman, 2013)

จากรายงานของ CDC สรุปการตรวจพบการระบาดของ *Salmonella* spp. ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003-2010 พบว่า ในปี ค.ศ. 2003-2007 มีการระบาด 129 ครั้ง และมีผู้ป่วย 3,290 ราย คิดเป็นร้อยละ 17 ของการเจ็บป่วย ปี ค.ศ. 2008 มีการระบาด 117 ครั้ง และมีผู้ป่วย 4,960 ราย คิดเป็นร้อยละ 27 ปี ค.ศ. 2009 และ 2010 พบการระบาด 117 และ 126 ครั้ง และมีผู้ป่วย 2,954 และ 4,135 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.5 และ 12.5 ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าการระบาดเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* spp. ในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 2003-2010 (ดัดแปลงจาก CDC, 2011a; CDC, 2013)

Years	Outbreaks		Illnesses	
	Total No.	%	Total No.	%
2003-2007	129	17	3,290	17
2008	117	18	4,960	27
2009	117	11.5	2,954	11.5
2010	126	12.5	4,135	12.5

สำหรับประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. ในผักสดที่ส่งออกไปยังประเทศนอรเว ฟินแลนด์ และไอซ์แลนด์ ซึ่งถูกรายงานผ่านทางระบบการเตือนภัยเร่งด่วนสำหรับอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ (Rapid Alert System for Food and Feed; RASFF) ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-เดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2548 เป็นจำนวน 24 รายการ ส่งผลให้ประเทศนอรเว

ประกาศห้ามนำเข้าสินค้าผักจากประเทศไทยเป็นการชั่วคราว ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 เป็นต้นมา อีกทั้งได้มีจดหมายเตือนจาก DG-SANCO, Health and Consumer Protection ของสหภาพยุโรปถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น และขอให้ประเทศไทยดำเนินการแก้ไข นอกจากนี้ประเทศฟินแลนด์ยังได้ออกมาตรการควบคุม โดยกำหนดให้สินค้าผักทุกชนิดจากประเทศไทยต้องมีใบรับรองปลอดเชื้อจุลินทรีย์กำกับ ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2548 เป็นต้นมา ขณะที่ประเทศไอซ์แลนด์ ได้ออกมาตรการควบคุม ตั้งแต่วันที่ 25 สิงหาคม พ.ศ. 2548 กำหนดให้สินค้าผักสดจากประเทศไทยจะต้องมีหนังสือรับรองสุขอนามัย (Health Certificate) ทุกครั้งที่มีการส่งออก (วิชา ธิติประเสริฐ และคณะ, 2549)

อาหารที่มักพบรายงานการระบาดของโรคซัลโมเนโลซิส มักเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของไข่หรือไก่ โดยในช่วงทศวรรษที่ 1970 เป็นต้นมา พบว่าร้อยละ 5 ของการระบาดจากโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดที่เกิดในสหรัฐอเมริกา เกิดจาก *S.* Enteritidis โดยในระหว่างปี ค.ศ. 1985-1995 พบ *S.* Enteritidis จากไข่ไก่ทั้งฟองทำให้เกิดการระบาดของโรคซัลโมเนโลซิส ขึ้น 582 ครั้ง ในสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยจำนวน 34,058 ราย เสียชีวิต 70 ราย การระบาดที่เกิดจาก *S.* Enteritidis พบว่าร้อยละ 77 เกิดจากไข่เกรด A ทั้งฟองหรืออาหารที่มีไข่ไก่เป็นส่วนประกอบ เฉพาะในปี ค.ศ. 1989 เพียงปีเดียว การระบาดร้อยละ 20 มีสาเหตุจาก *S.* Enteritidis และซีโรวาร์ที่พบมากเป็นลำดับสองรองจาก *S.* Enteritidis คือ *S.* Typhimurium ส่วนในปี ค.ศ. 1987 พบซีโรวาร์นี้ ร้อยละ 16 ของซีโรวาร์ทั้งหมด (Tauxe, 1991; สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ส่วนในประเทศไทยมีการตรวจพบ *Salmonella* ในอาหารต่าง ๆ หลายซีโรวาร์ ซึ่งการปนเปื้อนจะแตกต่างกันในแต่ละชนิดของอาหาร (แสดงในภาคผนวก ก ตารางที่ 25)

กะทิและการผลิตกะทิ

1. กะทิสดและกระบวนการผลิต

กะทิเป็นของเหลวที่ได้จากการคั้นเนื้อมะพร้าวสดขูด อาจเติมน้ำหรือไม่เติมก็ได้ มีลักษณะเป็นอิมัลชัน (Emulsion) ชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil in Water) กะทิอิมัลซิไฟเออร์โดยธรรมชาติทำให้อิมัลชันมีความคงตัวเพิ่มขึ้น แต่ยังไม่พอเพียงที่ทำให้กะทิคงตัวอยู่ได้ เนื่องจากมีปริมาณของไขมันอยู่มากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีน โดยอัตราส่วนในการรวมตัวของไขมันและโปรตีนเป็น 1 ต่อ 10 ความเข้มข้นของโปรตีนที่พื้นผิวระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำ มีไม่มากพอที่จะป้องกันการรวมตัว (Coalescence) ของเม็ดไขมันได้ เม็ดไขมันจึงมีแนวโน้มที่จะจับตัวกันและแยกชั้นออกมา การรวมตัวของเม็ดไขมันก่อให้เกิดครีมและลอยแยกออกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นชั้นของหางกะทิ (Coconut Skim Milk) และชั้นบนเป็นหัวกะทิ (Coconut Cream) โดยเริ่มเกิดการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 ชั่วโมง จนกระทั่งแยกชั้นสมบูรณ์ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการแยกชั้นนี้ไม่ใช่เป็นการแตกตัวของอิมัลชันอย่างสมบูรณ์ สามารถเขย่าให้กลับเป็นเนื้อเดียวกันได้อีก (กนกพร ลีลาวิโรจน์สกุล, 2545)

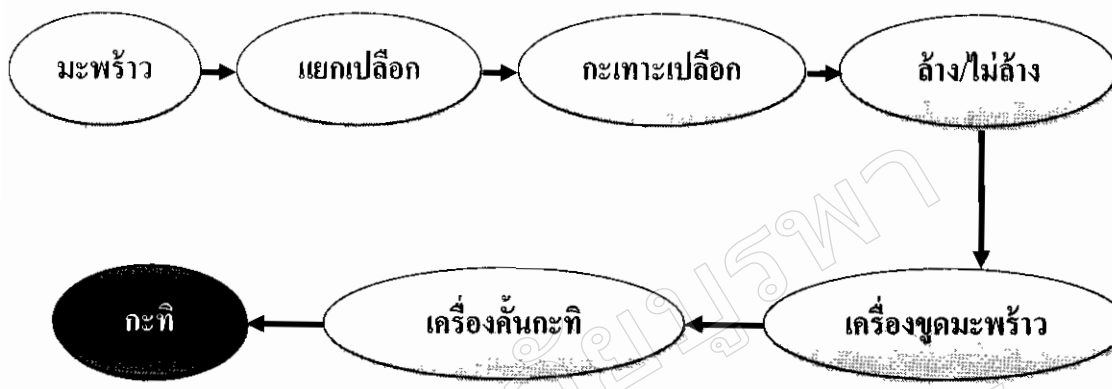
1.1 สารอาหารที่เป็นองค์ประกอบของน้ำกะทิ

องค์ประกอบที่สำคัญที่อยู่ในน้ำกะทิที่คั้นโดยไม่ใช้น้ำเป็นส่วนผสม พบว่ามีสารอาหารที่เป็นประโยชน์มากมายหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน ร้อยละ 2.6-4.4 ไขมัน ร้อยละ 32-40 เถ้าทั้งหมด ร้อยละ 1.0-1.5 และน้ำ ร้อยละ 50-54 ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อายุของมะพร้าว วิธีการคั้น เป็นต้น (Tangsuphoom & Coupland, 2005) โดยปกติ น้ำกะทิ 100 กรัมจะมีพลังงานประมาณ 170-190 กิโลแคลอรี (Kcal) (บริษัทเทพผดุงพร จำกัด, 2551)

1.2 การผลิตน้ำกะทิ

ขั้นแรกเป็นการใช้ แรงงานคน เช่น การปอกเปลือกและกะลา ปอกส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออกเพราะจะทำให้กะทิมีสีน้ำตาลและมีรสขม เนื้อมะพร้าวที่ได้นำมาล้างน้ำแล้วขูดด้วยเครื่องจักร การล้างเนื้อมะพร้าวด้วยน้ำที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น ร้อยส่วนในล้านส่วน (ppm) ตามด้วยการลวกน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ การคั้นกะทิในระดับครัวเรือน จะบีบเนื้อมะพร้าวที่ห่อด้วยผ้าขาวบางด้วยมือ เพื่อแยกเอาส่วนกะทิออกมา ปกติการคั้น 2-3 ครั้ง โดยการเติมน้ำที่อุณหภูมิห้องลงไปทำให้กะทิที่ได้ในแต่ละครั้งเจือจางลง เพื่อต้องการให้ได้กะทิในปริมาณมากที่สุด สำหรับการคั้นกะทิในระดับอุตสาหกรรมจะใช้เครื่องคั้นแบบไฮโดรลิค (Hydraulic) หรือ ใช้เครื่องคั้นกะทิแบบกลไกการคั้นเป็นเกลียว (Screw Press) บีบอัด กะทิที่ได้นำมากรองผ่านผ้าขาวบางหรือนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำโดยใช้บาสเก็ต เซ็นตริฟิวจ์ (Basket

Centrifuge) เพื่อแยกเอาอนุภาคเล็ก ๆ ที่หลงเหลืออยู่ออกโดยไม่ทำให้สภาพอิมัลชันของกะทิเสียไป (กนกพร ลีลาวิโรจน์สกุล, 2545) ซึ่งสรุปไว้ดังแผนภูมิในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการผลิตน้ำกะทิ (นุชรา บุญกนก และคณะ, 2550)

2. กะทิสำเร็จรูป

เป็นของเหลวที่ได้จากการคั้นหรือบีบเนื้อของผลมะพร้าวห้าวแล้วผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนเพื่อให้เก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น ปัจจุบันมีการบรรจุกะทิในบรรจุภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ถุงพลาสติก กล่องยูเอชที เป็นต้น สำหรับจำหน่ายเป็นกะทิสำเร็จรูป ทำให้ผู้บริโภคมีความสะดวกในการนำมาใช้ปรุงเป็นอาหารมากขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.1 ชนิดพาสเจอร์ไรซ์

เป็นกะทิสำเร็จรูปที่ใช้อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแต่อาจยังมีจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนเหลือรอดอยู่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กะทิชนิดนี้โดยการแช่เย็น หรือแช่เยือกแข็ง

2.2 ชนิดสเตอริไลซ์

เป็นกะทิสำเร็จรูปที่ผ่านการให้ความร้อน อุณหภูมิเกิน 100 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ และสปอร์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษา และรวมถึงการฆ่าเชื้อแบบ ยู เอช ที (UHT) ด้วย ซึ่งผลิตภัณฑ์กะทิสำเร็จรูปนี้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ (กองส่งเสริมและพัฒนาด้านการมาตรฐาน สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2550)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. ค่าเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของกะทิ

3.1 กะทิสด

ตามข้อกำหนดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กะทิสดจัดอยู่ในกลุ่มอาหารดิบ ซึ่งต้องผ่านการทำสุกหรือการเตรียมด้วยกรรมวิธีใดก่อนบริโภค โดยได้มีการกำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบไว้ ดังนี้คือ Total Plate Count (น้อยกว่า 60 โคโลนีต่อกรัม) *Escherichia coli* (น้อยกว่า 20 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Staphylococcus aureus* (น้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม) *Vibrio parahaemolyticus* (น้อยกว่า 100 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) และต้องไม่พบ *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholera*e (ใน 25 กรัม อาหาร) (กองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2544)

3.2 กะทิสำเร็จรูป

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้มีการประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 582 (พ.ศ. 2528) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกะทิสำเร็จรูป โดยกะทิสำเร็จรูปจะแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดพาสเจอร์ไรซ์ และชนิดสเตอริไลซ์ โดยมีจุลินทรีย์ได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้

3.2.1 ชนิดพาสเจอร์ไรซ์: Total Plate Count (น้อยกว่า 20,000 โคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตร) Coliform Bacteria (น้อยกว่า 3 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมหรือมิลลิลิตร) ต้องไม่พบ *Salmonella* spp. (ใน 25 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) *S. aureus* และ Yeast and Mold (ใน 10 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) *Clostridium perfringens* (ใน 0.1 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร)

3.2.2 ชนิดสเตอริไลซ์: ต้องไม่พบ Total Plate Count (ใน 1 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) *Salmonella* spp. (ใน 25 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) *S. aureus* และ Yeast and Mold (ใน 10 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) *Clostridium perfringens* (ใน 0.1 กรัมหรือมิลลิลิตรอาหาร) Coliform Bacteria (น้อยกว่า 3 เอ็มพีเอ็นต่อกรัมหรือมิลลิลิตร) (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม [สมอ.], 2528ก)

3.3 กะทิผง

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้มีการประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 583 (พ.ศ. 2528) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกะทิผง โดยกะทิผงจะมีจุลินทรีย์ได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้คือ Total Plate Count (น้อยกว่า 1.0×10^4 โคโลนีต่อกรัม) Coliform Bacteria (น้อยกว่า 3 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) ต้องไม่พบ *Salmonella* spp.

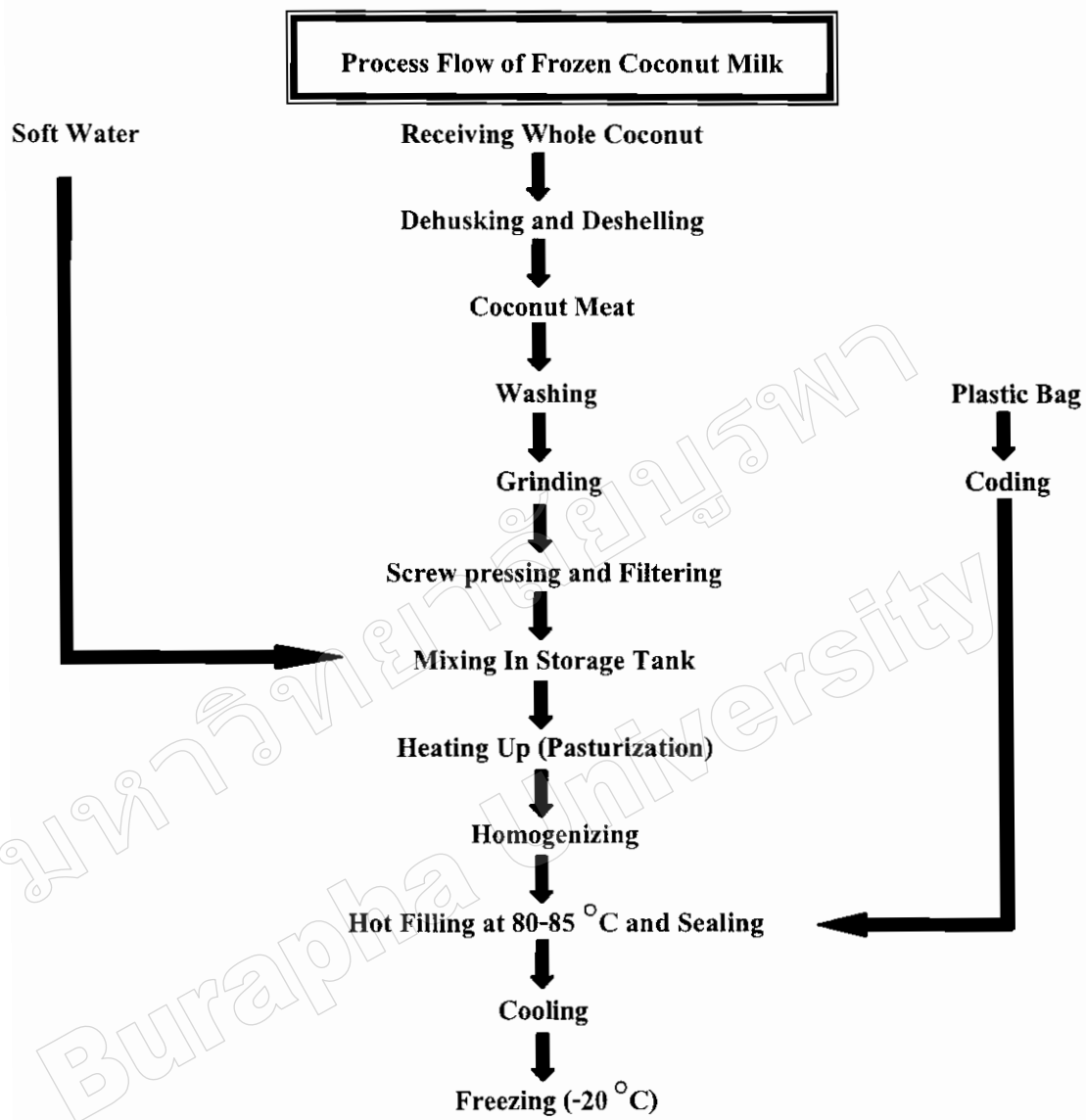
(ใน 25 กรัมอาหาร) *S. aureus* (ใน 10 กรัมอาหาร) *Clostridium perfringens* (ใน 0.1 กรัมอาหาร) และ Yeast and Mold (น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม) (สมอ., 2528ข)

นอกจากนั้นสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้มีการประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 928 (พ.ศ. 2533) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง กำหนดสุขลักษณะสำหรับอาหารเยือกแข็ง โดยกำหนดให้มีการผลิตหรือจัดเตรียมอาหารแช่แข็งให้เป็นไปตามข้อกำหนดดังกล่าว ส่วนข้อกำหนดของเชื้อจุลินทรีย์ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์พื้นฐานของมาตรฐานการผลิตอาหารทั่วไป หรือเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารเยือกแข็ง ตามข้อกำหนดของคณะกรรมการตรวจสอบอาหารทางจุลชีววิทยาระหว่างประเทศ (International Commission on Microbiological Specification for Foods; ICMSF) โดยมีข้อกำหนดดังนี้คือ Total Plate Count (น้อยกว่า 10^5 โคโลนีต่อกรัม) Coliform Bacteria (น้อยกว่า 10^2 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) *E. coli* (น้อยกว่า 2 เอ็มพีเอ็นต่อกรัม) ต้องไม่พบ *Salmonella* spp. (ใน 25 กรัมอาหาร) และ *S. aureus* (น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม) (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; สมอ., 2533)

4. การผลิตน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง

เนื่องจากน้ำกะทิเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการปรุงอาหารหรือทำขนมของคนไทย ทำให้มีการผลิตและจำหน่ายกะทิเป็นจำนวนมาก แต่เนื่องด้วยกะทิมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สำคัญซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ทำให้กะทิสดเกิดการเน่าเสียได้ง่าย และอาจไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกะทิในรูปของกะทิสำเร็จรูป ได้แก่ กะทิพาสเจอร์ไรซ์และสเตอริไลซ์ แต่กลิ่นและรสชาติของกะทิสเตอร์ริไลซ์ก็อาจไม่เป็นที่พอใจของผู้บริโภคเท่ากับกะทิสด สำหรับกะทิพาสเจอร์ไรซ์นั้นแม้จะเก็บแบบแช่เย็นก็ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการผลิตกะทิในรูปแบบของการแช่เยือกแข็ง เพื่อให้มีกลิ่น สี หรือรสชาติใกล้เคียงกับกะทิสด รวมทั้งยังสามารถเก็บรักษากะทิไว้ใช้ได้นานขึ้นอีกด้วย

การผลิตน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง มีกรรมวิธีและขั้นตอนการผลิตขั้นต้นเช่นเดียวกับน้ำกะทิสด เมื่อได้น้ำกะทิสดแล้วจะนำมาให้ความร้อนที่ระดับพาสเจอไรซ์ (เช่น ใช้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) พร้อมกับการกวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) จากนั้นบรรจุใส่ถุงทนความร้อนและเย็นในขณะร้อน (Hot Filling) และนำไปทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว (Rapid Cooling Down) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง โดยในระดับอุตสาหกรรมมักใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส น้ำกะทิแช่เยือกแข็งจะมีอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 1 ปี (บริษัทผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด, 2553) ตัวอย่างกระบวนการผลิตน้ำกะทิแช่เยือกแข็งแสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนและวิธีการผลิตน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง (บริษัทผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด, 2553)

เทคนิคการเก็บรักษาอาหารโดยการแช่เยือกแข็ง

ในปัจจุบันการแช่เยือกแข็งเป็นวิธีการถนอมอาหารที่นิยมทำกันมาก เนื่องจากเป็นการรักษาสภาพของอาหารให้มีคุณค่าทางโภชนาการได้ใกล้เคียงกับอาหารสด อีกทั้งยังมีรสชาติ กลิ่น และสีของอาหารที่ดีอีกด้วย การแช่เยือกแข็งสามารถทำได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ผัก ผลไม้ เนื้อ และปลา เป็นต้น นอกจากนั้นการแช่เยือกแข็งยังเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการผลิตอาหารบางชนิด ได้แก่ ไอศกรีม น้ำแข็ง โดยส่วนใหญ่พบว่าอาหารแช่เยือกแข็งมักมีการทำให้อาหารสุกก่อนเพื่อลดอันตรายและกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง (Berry, Fletcher, McClure, & Wilkinson, 2008) ถึงแม้ว่าการแช่เยือกแข็งจะเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารเป็นอย่างมาก แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การแช่เยือกแข็งไม่เหมาะกับอาหารบางชนิด เพราะจะทำให้คุณค่าทางอาหารและลักษณะกายภาพประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งยังไม่สามารถกำจัดหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารบางชนิดให้หมดไปได้ (Golden & Arroyo-Gallyoun, 1997)

1. หลักการและทฤษฎี

การแช่เยือกแข็งเป็นกรรมวิธีการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำลงกว่าจุดเยือกแข็ง โดยส่วนของน้ำจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นผลึกน้ำแข็ง การตรึงน้ำกับน้ำแข็งและผลจากการเข้มข้นขึ้นของตัวละลายในน้ำที่ยังไม่แข็งตัวจะทำให้ค่า a_w ของอาหารลดลง จึงถือเป็นการถนอมรักษาอาหารโดยการลดอุณหภูมิ ลดค่า a_w ถ้าใช้วิธีการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม อาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านโภชนาการและประสาทสัมผัสน้อยมาก (Barbara, 2000)

2. วิธีการแช่เยือกแข็ง

การแช่เยือกแข็งคือการถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ปกติจะใช้อุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส เพื่อให้น้ำที่อยู่ในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง วิธีนี้สามารถเก็บอาหารได้นานเป็นปี วิธีการแช่เยือกแข็งอาหารแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

2.1 การแช่เยือกแข็งแบบช้า (Slow Freezing)

เป็นวิธีการทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็งอย่างช้า ๆ โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า -5 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 3-72 ชั่วโมง เช่น การแช่อาหารในช่องทำน้ำแข็ง (Freezer) ของตู้เย็นที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน วิธีการแช่เยือกแข็งแบบนี้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในอาหารจะมีขนาดใหญ่ และจะไปทิ่มแทงผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ของอาหารที่แช่เยือกแข็ง ทำให้เกิดการฉีกขาด ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของอาหาร เมื่อนำอาหารมาละลาย (Thawing) อาหารจะมีลักษณะเละ ชุ่มน้ำ เนื่องจากของเหลวในเซลล์อาหารไหลออกมา ซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

2.2 การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว (Quick Freezing หรือ Fast Freezing)

เป็นวิธีการทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว โดยใช้อุณหภูมิต่ำตั้งแต่ -17 องศาเซลเซียส ถึง -45.6 องศาเซลเซียส และใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที วิธีนี้จะได้ผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กซึ่งไม่ทำลายเซลล์อาหารมากเหมือนการแช่เยือกแข็งแบบช้า การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็วสามารถทำได้ 4 วิธี คือ 1) การจุ่มอาหารลงโดยตรงในน้ำยา หรือสารให้ความเย็น (Refrigerant) ถ้าต้องการอุณหภูมิต่ำมากนิยมใช้สารจำพวกฟรีออน (Freon) ซึ่งมีหลายระดับชั้น แต่ที่นิยมกันได้แก่ ฟรีออน -12 มีจุดเดือดที่ -28.4 องศาเซลเซียส สามารถทำให้อาหารแข็งตัวกลายเป็นน้ำแข็งในเวลาไม่กี่วินาที 2) ใช้ลมเย็นเป่าลงบนอาหาร (Air Blast) โดยมากจะใช้แอมโมเนีย และมักนิยมบรรจุอาหารในภาชนะบรรจุก่อนนำมาทำเยือกแข็ง อุณหภูมิของลมเย็นที่เป่าลงบนอาหารจะประมาณ -34.1 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า 3) ใช้แรงลมเป่าให้อาหารลอยตัว (Fluidized Bed Freezing) ทำให้การถ่ายเทความร้อนเป็นไปอย่างรวดเร็วมากเนื่องจากผิวหน้าของอาหารสัมผัสกับลมเย็นรอบด้าน และช่วยให้อาหารมีลักษณะไม่แข็งติดกันเป็นก้อน เหมาะกับอาหารที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ และ 4) การใช้แผ่นความเย็น (Plate Freezer) อาหารจะถูกนำไปวางบนแผ่นโลหะที่ไม่เป็นสนิม เรียงเป็นชั้นซ้อนกัน ส่งสารให้ความเย็นผ่านไปตามท่อระหว่างชั้นของแผ่นโลหะ แล้วจึงอัดแผ่นโลหะให้ผิวหน้าแนบสนิทกับชิ้นอาหาร ทำให้มีอุณหภูมิต่ำลงถึง -18 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและความหนาของอาหาร (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; สุมาลี เหลืองสกุล, 2541; Golden & Arroyo-Gallyoun, 1997)

การแช่เยือกแข็งแบบช้าและแบบรวดเร็วมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันคือ การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็วจะทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กกว่า ใช้เวลาในกระบวนการน้อยกว่า ทำให้เซลล์ต่าง ๆ ของอาหารถูกทำลายได้น้อยกว่า และเมื่อนำอาหารไปละลายน้ำแข็งก็จะสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อยกว่าการแช่เยือกแข็งแบบช้า แต่ก็มีข้อเสียคือ ใช้พลังงานที่ทำเยือกแข็งมากกว่า ทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิต ทำให้เกิด Cold Shock ได้อย่างรวดเร็ว และเซลล์ของเชื้อจะถูกทำลายได้น้อยกว่าการแช่แข็งแบบช้า (Golden & Arroyo-Gallyoun, 1997) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็วและแบบช้า

(ดัดแปลงจาก บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; Golden & Arroyo-Gallyoun, 1997)

การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว	**การแช่เยือกแข็งแบบช้า**
ข้อดี	*ข้อเสีย*
- ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กกว่า - ใช้เวลาน้อยกว่า - เมื่อนำอาหารไปละลายน้ำแข็ง อาหารจะเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อยกว่า - เซลล์ต่าง ๆ ของอาหารถูกทำลายได้น้อยกว่า	- ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่กว่า - ใช้เวลานานกว่า - เมื่อนำอาหารไปละลายน้ำแข็ง อาหารจะเสียคุณค่าทางโภชนาการมากกว่า - เซลล์ต่าง ๆ ของอาหารถูกทำลายได้มากกว่า
ข้อเสีย	*ข้อดี*
- ใช้พลังงานที่ทำเยือกแข็งมากกว่า - เกิด Cold Shock ได้อย่างรวดเร็ว อาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์ทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี - เซลล์ของเชื้อจะถูกทำลายได้น้อยกว่า	- ใช้พลังงานที่ทำเยือกแข็งน้อยกว่า - ไม่เกิดปฏิกิริยา Cold Shock ลดการทนต่อการแช่เยือกแข็งของจุลินทรีย์ - เซลล์ของเชื้อจะถูกทำลายได้มากกว่า

3. การเปลี่ยนแปลงของอาหารและจุลชีววิทยาของอาหารแช่เยือกแข็ง

3.1 การเปลี่ยนแปลงในขณะเยือกแข็ง

กระบวนการเยือกแข็งจะลดการทำงานของเอนไซม์และปฏิกิริยาทางเคมีในอาหารอย่างรวดเร็ว และยังไปหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารด้วย ในการแช่เยือกแข็งแบบช้าก็ให้ผลเช่นเดียกันแต่ช้ากว่า การแช่เยือกแข็งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คืออาหารจะขยายตัวขึ้นและเกิดผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจากการเยือกแข็งแบบช้าจะมีการสะสมของน้ำแข็งระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อมากกว่าแบบรวดเร็ว ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์แตกได้ น้ำในเซลล์จะถูกดูดออกมากลายเป็นน้ำแข็งซึ่งทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงขึ้นกว่าเดิมและทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลงเรื่อย ๆ จนกว่าจะเกิดสภาพคงที่ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นสามารถทำลายเซลล์ของเนื้อเยื่อและเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ และการเพิ่มความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์จะทำให้เกลือแร่แพร่ออกจากเซลล์ เกิดการแห้งรวมทั้งการเสียคุณสมบัติของโปรตีน จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารคอลลอยด์ และเป็นผลทำให้จุลินทรีย์ถูกทำลายได้

3.2 การเปลี่ยนแปลงในขณะเก็บรักษา

ในขณะที่อาหารถูกเก็บรักษาไว้ในสภาพเยือกแข็ง ปฏิกิริยาทางเคมีและเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ตัวอย่างเช่น โปรตีนในเนื้อสัตว์ จะเกิดการเปลี่ยนแปลง สีแดงของไมโอโกลบิน (Myoglobin) โดยเฉพาะที่ผิวอาจถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสีน้ำตาลของเมตไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) ไขมันในเนื้อสัตว์และปลาอาจถูกออกซิไดซ์และไฮโดรไลซ์ ถ้าอุณหภูมิในขณะเก็บไม่คงที่จะทำให้ขนาดของผลึกน้ำแข็งใหญ่ขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้อาหารเกิดความเสียหายได้ เมื่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพเยือกแข็งจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และเมื่ออยู่ในสภาพนี้นานเป็นระยะเวลาหนึ่ง จุลินทรีย์จะตายด้วยอัตราที่ต่างกัน โดยบางชนิดสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานเป็นเดือนหรือปี

3.3 การเปลี่ยนแปลงในขณะปล่อยให้อาหารละลาย

เมื่อน้ำแข็งละลาย ของเหลวจะถูกดูดเข้าไปในเซลล์เนื้อเยื่อใหม่ และบางส่วนจะไหลออกมาจากอาหาร การปล่อยให้อาหารละลายอย่างช้า ๆ จะทำให้ความชื้นกลับเข้าเซลล์เนื้อเยื่อได้ดีกว่าการทำให้ละลายอย่างเร็ว และอาหารจะมีสภาพเหมือนเมื่อก่อนเยือกแข็งได้มากกว่าอีกด้วย ถ้าการละลายเป็นไปโดยเร็วและอาหารถูกนำไปปรุงทันที มักไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ถ้าการละลายเป็นไปอย่างช้า ๆ และทิ้งอาหารไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน ก็อาจจะมีการเพิ่มจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ ส่วนชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในขณะละลาย ระยะเวลาที่อาหารถูกทิ้งไว้หลังจากละลายแล้ว รวมถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนก่อนทำการแช่เยือกแข็งด้วย (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

4. ผลของการแช่เยือกแข็งต่อเชื้อจุลินทรีย์

การอธิบายผลของการแช่เยือกแข็งที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์มีความซับซ้อน ที่สำคัญคือไม่สามารถศึกษาผลที่เกิดจากการแช่เยือกแข็งโดยไม่มีผลที่เกิดจากการทำให้เย็น หรือผลที่เกิดจากการละลายมาเกี่ยวข้อง โดยทั่วไปแล้วผลที่เกิดจากการแช่เยือกแข็งต่อเชื้อจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับ (1) การทำให้เซลล์เย็นถึง 0 องศาเซลเซียส (2) การทำให้เย็นจะดำเนินต่อไปจนเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายนอกและภายในเซลล์ (3) ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่อยู่ทั้งภายในและนอกเซลล์ (4) การเก็บเซลล์ไว้ในสภาพเยือกแข็ง และ (5) การละลายของเซลล์จุลินทรีย์และอาหาร (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

การแช่เยือกแข็งไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ในอาหารให้หมดไปได้ เพียงแต่มีผลให้จุลินทรีย์ทั่วไปหยุดการเจริญและการเพิ่มจำนวน (Robinson, 2004) และอาจมีผลทำให้จุลินทรีย์บางชนิดตาย (Lethal) หรือบาดเจ็บ (Sub-Lethal) ในระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง การลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เกิดขึ้นได้เนื่องมาจากการถูกทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์

ไรโบโซม หรือแม้กระทั่งดีเอ็นเอนั่นเอง ซึ่งการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ เช่น โปรตีน ฟอสโฟลิปิด ไลโปโพลีแซคคาไรด์ จึงมีผลทำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

การแช่เยือกแข็งมีผลให้เกิดการลดจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหาร อาจเนื่องมาจากการแช่เยือกแข็งทำให้จุลินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับที่ทำให้ตาย (Lethal Effect) หรือในระดับที่ทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ (Sub-Lethal Effect) ก็ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับที่ทำให้ตาย คาดว่าจะเกิดจากการที่โปรตีนหรือเอนไซม์ที่จำเป็นในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป และอาจมีผลมาจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนการเยือกแข็ง หรืออาจเป็นเพราะสภาพทางกายภาพของเซลล์เกิดความเสียหายเนื่องจากผลึกน้ำแข็ง การลดอุณหภูมิจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิที่เหมาะสมจนถึง 0 องศาเซลเซียส อาจทำให้จุลินทรีย์ตายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophile) และกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) ซึ่งเรียกว่า "การช็อก ด้วยความเย็น" (Cold Shock) และคาดว่ามีความเกี่ยวข้องกับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เซลล์เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ หรือทำให้การทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เกิดความผิดปกติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงในระดับที่ทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ลดลงนั้นเกิดจากบางเซลล์ที่เพียงแต่เกิดความเสียหายบางส่วนจนไม่สามารถเจริญให้เห็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เท่านั้น แต่ถ้าทิ้งระยะเวลาให้นานพอสมควรให้มีการซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย หรือมีการเติมสารอาหารบางชนิดให้แก่เซลล์ ก็อาจจะเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้อีก (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541) อาจเรียกเซลล์ประเภทนี้ว่า "เซลล์บาดเจ็บ" (Injured Cells)

ผลของการแช่เยือกแข็งต่อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. พบว่า *S. aureus* สามารถทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งได้ดี สามารถอยู่รอดในอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ -20 องศาเซลเซียส (Robinson et al., 2000) และพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ (-10 ถึง 0 องศาเซลเซียส) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงในระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง (ICMSF, 1996) ถึงแม้เซลล์ปกติอาจเกิดการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งได้ แต่การแช่เยือกแข็ง ไม่สามารถทำลายสารพิษเอนเทอโรทอกซิน ที่ *S. aureus* สร้างออกมาในอาหารได้ (Douglas, 2004) การแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งมีผลเล็กน้อยต่อ *S. aureus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส แต่เซลล์ที่ถูกแช่เยือกแข็งที่สภาวะนี้จะอ่อนแอต่อสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ7.5 มากกว่าเชื้อที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่ได้ถูกแช่เยือกแข็ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแช่เยือกแข็งไม่ทำให้ *S. aureus* ตาย แต่ทำให้เกิดการบาดเจ็บ บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้กระบวนการเมตาบอลิกและกิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป การแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งมีผลทำให้เชื้ออ่อนแอต่อค่าพีเอช

ที่ 3.8 (Bergdoll, 1989) และเมื่อเทียบกับ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. พบว่า *S. aureus* สามารถต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งได้ดีกว่า (Douglas, 2004) สำหรับ *Salmonella* spp. นั้นสามารถมีชีวิตรอดจากการทำแห้งและแช่เยือกแข็งได้เป็นเวลานาน (Ray & Bhunia, 2008) มีรายงานว่า *S.* Typhimurium สามารถมีชีวิตรอดจากการแช่เยือกแข็งปลาที่ -22 องศาเซลเซียส และเก็บที่ -17.9 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 1 ปี โดยที่จำนวนเชื้อลดลงเพียง 1 Log_{10} เท่านั้น ถึงแม้จะมีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี แต่ก็ไวต่อการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็ง (Douglas, 2004) มีรายงานว่า *S.* Typhimurium สามารถรอดชีวิตใน Chow Mein ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 เดือน และยังสามารถแยกเชื้อ *S.* Enteritidis กับ *S.* Typhimurium จากไอศกรีมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ปี (D'Aoust, 1989) มีการศึกษาถึงการรอดชีวิตของ *S.* Kentucky ในการแช่เยือกแข็งเนื้อสัตว์ต่างชนิดกัน โดยพบว่าเนื้อสัตว์ที่มีปริมาณไขมันที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการรอดชีวิตและการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งของเชื้อต่างกันด้วย (Sheridan, 1997)

5. รายงานการตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแช่เยือกแข็ง

มีรายงานการตราจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแช่เยือกแข็งอยู่บ่อยครั้ง แต่ละครั้งมักพบว่ามีผู้ที่เจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารแช่เยือกแข็งเป็นจำนวนมาก (Georgala & Hurst, 1963) ถึงแม้อาหารเหล่านั้นจะถูกตรวจสอบมาตรฐานความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์แล้วก็ตาม จึงทำให้สามารถยืนยันได้ว่าการแช่เยือกแข็งไม่สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากกระบวนการผลิตก่อนการแช่เยือกแข็งให้หมดไปได้ และการแช่เยือกแข็งยังทำให้จุลินทรีย์บางเซลล์เกิดการบาดเจ็บและไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารคัดเลือก (Selective Agents) (Wu, 2008) และส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการรายงานผลการทดสอบด้วย

อาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* ที่เกิดจากการบริโภคอาหารแช่เยือกแข็ง ส่วนใหญ่มักเกิดจากแบคทีเรียสร้างสารพิษออกมาในอาหารก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง และสารพิษดังกล่าวไม่ถูกทำลายในอาหารแช่เยือกแข็ง ถึงแม้จะนำอาหารแช่เยือกแข็งไปให้ความร้อนก่อนการบริโภคก็ตาม ส่วน *Salmonella* spp. ก็พบว่าสามารถรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งอาหารได้ดีเช่นกัน (Douglas, 2004)

คณะกรรมาธิการสหภาพยุโรป (EU) ได้รายงานและแจ้งเตือนเกี่ยวกับสินค้าจากประเทศไทยที่มีการตราจพบสิ่งที่เป็นพิษในอาหารผ่านระบบเตือนภัย (RASFF) ในปี ค.ศ. 2004-2006 จากตัวอย่างอาหารที่รายงานทั้งหมด 242 รายการ พบว่าเป็นตัวอย่างอาหารแช่เยือกแข็งที่ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 8 รายการ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อาหารแช่แข็งของประเทศไทยที่ถูกแจ้งเตือนในระบบ RASFF ปี ค.ศ. 2004-2006 (คณะกรรมาธิการสหภาพยุโรป, ม.ป.ป.)

รายการที่	ประเภท	วันที่แจ้ง	ประเทศที่แจ้ง	รายการที่แจ้ง
รายงาน RASFF ปี ค.ศ. 2004				
1	A	07/01/2004	Finland	*Salmonella* Enteritidis in raw frozen chicken breast fillets
8	A	22/04/2004	Sweden	*Salmonella* in frozen chicken boneless skinless breast meat
14	I	18/06/2004	Italy	*Vibrio paranaemolyticus* in frozen raw headless shell on shrimps
28	I	21/09/2004	Italy	*Vibrio parahaemolyticus* in frozen head on shell blanched prawns (*Penaeus vannamei*)
รายงาน RASFF ปี ค.ศ. 2005				
10	I	25/02/2005	Sweden	*Salmonella* in frozen chicken fillet
72	I	30/08/2005	Italy	Too high count of aerobic mesophiles in frozen boiled clams (*Meretrix lusoria*)
รายงาน RASFF ปี ค.ศ. 2006				
9	A	24/02/2006	Italy	*Yensinia enterocolitica* in frozen squid (*Loligo* spp.)
46	A	31/07/2006	Netherlands	*Salmonella* in frozen fully cooked chicken meat

Remark A - Alert Notification I - Information Notification

สำหรับน้ำกะทิแช่เยือกแข็งพบว่ายังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. จากระบบแจ้งเตือนภัย RASFF นอกจากสรุปผลการตรวจคุณภาพสินค้าส่งออกด้านพืช ของกรมวิชาการเกษตร และมีการรายงานการระบาดและตรวจพบ *Vibrio cholerae* ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็งที่นำเข้าจากประเทศไทย ในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 1991 (Douglas, 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับรายงานการตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแช่เยือกแข็ง จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ นั้น เนื่องจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้า สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร ได้รับภารกิจในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารที่ผลิตหรือแปรรูปจากพืชเพื่อการส่งออก ดังนั้นผู้ประกอบการผลิตอาหารในขอบข่ายดังกล่าว จะต้องส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ให้เป็นไปตามมาตรฐานของผู้นำเข้า ซึ่งพบว่าสินค้าส่วนใหญ่ที่ส่งออกมีคุณภาพและเป็นไปตามมาตรฐาน แต่ก็มีหลาย ๆ กลุ่มผลิตภัณฑ์ ที่พบว่าไม่เป็นไปตามข้อกำหนดของผู้นำเข้า จึงส่งผลให้ถูกอายัติหรือถูกจำกัดการส่งออกของสินค้าเหล่านั้น กลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีรายงานการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเกินเกณฑ์มาตรฐานอาหารแช่เยือกแข็งตามข้อกำหนดของ ICMSF โดยตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2549 จนถึง เดือนมีนาคม 2552 ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาฯ ได้ทำการตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารแช่เยือกแข็งจำนวน 156 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเกินเกณฑ์ที่กำหนดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 9.62 ของตัวอย่างอาหารแช่เยือกแข็งทั้งหมด) และจากตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อทั้งหมด พบว่าเป็นตัวอย่างน้ำกะทิและผลิตภัณฑ์ที่มีกะทิหรือมะพร้าวเป็นองค์ประกอบทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 46.67 ของตัวอย่างที่ตรวจพบ) ซึ่งในจำนวนนี้ตรวจพบ *S. aureus* ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง 2 ตัวอย่าง ขนมรวมมิตรน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง 1 ตัวอย่าง และเนื้อมะพร้าวหั่น 1 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Salmonella* spp. ในน้ำกะทิแช่เยือกแข็ง 1 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 8 จึงทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งเหล่านี้ถูกระงับการส่งออกและการออกหนังสือรับรองสุขอนามัย (Health Certification) ซึ่งมีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งดังกล่าว และทำให้สูญเสียรายได้จากการส่งออกของประเทศ (วฤษณี ขาวเขียว, 2552)

ตารางที่ 8 รายงานการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแช่เยือกแข็ง (วฤษณี ขาวเขียว, 2552)

ลำดับที่	เดือนที่ตรวจพบ	ชนิดอาหาร	รายการที่ตรวจพบเกินเกณฑ์ที่ ICMSF กำหนด
1	มีนาคม 2549	ขนมปัง	พบ *S. aureus* เกินเกณฑ์ที่กำหนด
2	เมษายน 2549	ขนมปัง	พบ Total Mold Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด
3	มิถุนายน 2549	ขนมสาคูน้ำกะทิ	พบ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
4	กรกฎาคม 2549	แป้งห่อไส้ผัก (Samosa)	พบ *S. aureus*, Coliforms และ Total Plate Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด
5	กรกฎาคม 2549	**ขนมรวมมิตรน้ำกะทิ**	**พบ *S. aureus*** และ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
6	พฤศจิกายน 2549	ขนมปัง	พบ Total Mold Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด
7	มกราคม 2550	**น้ำกะทิ**	**พบ *Salmonella* spp.** และ Total Yeast and Mold Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด
8	มีนาคม 2550	แป้งห่อไส้ผัก (Samosa)	พบ Coliforms และ Total Plate Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด
9	มีนาคม 2550	ขนมลูกชุบ	พบ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
10	มกราคม 2551	**น้ำกะทิ**	**พบ *S. aureus*** เกินเกณฑ์ที่กำหนด
11	กันยายน 2551	**เนื้อมะพร้าวหั่น**	**พบ *S. aureus*** และ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
12	ตุลาคม 2551	ยีสต์	พบ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
13	พฤศจิกายน 2551	เนื้อมะพร้าวหั่น	พบ *E. coli* และ Coliforms เกินเกณฑ์ที่กำหนด
14	ธันวาคม 2551	**น้ำกะทิ**	**พบ *S. aureus*** เกินเกณฑ์ที่กำหนด
15	มกราคม 2552	ยีสต์	พบ Total Plate Count เกินเกณฑ์ที่กำหนด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การบาดเจ็บและการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

1. สาเหตุของการบาดเจ็บ

กรรมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตอาหารเช่น การให้ความร้อน การฉายรังสี การทำแห้ง การหมัก การใช้ความดัน การเติมสารกันเสีย หรือแม้กะทั่งการแช่เยือกแข็ง มีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ก็พบว่ายังมีรายงานการเจ็บป่วยที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวทั่วโลก ซึ่งมีสาเหตุสำคัญมาจากการรอดชีวิต (Survival) ของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหารที่ไม่เหมาะสม จึงส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่ถูกทำลายหรือตาย เพียงแต่ได้รับบาดเจ็บ (Injury) และหยุดการเจริญไปชั่วระยะเวลาหนึ่ง และสามารถฟื้นคืนชีวิต (Resuscitation) และเพิ่มจำนวน (Multiply) ได้เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม โดยยังคงคุณสมบัติในการก่อโรค (Viability) จากการบริโภคอาหารได้เหมือนเซลล์ที่มีชีวิตปกติอีกด้วย (Ray & Bhunia, 2008)

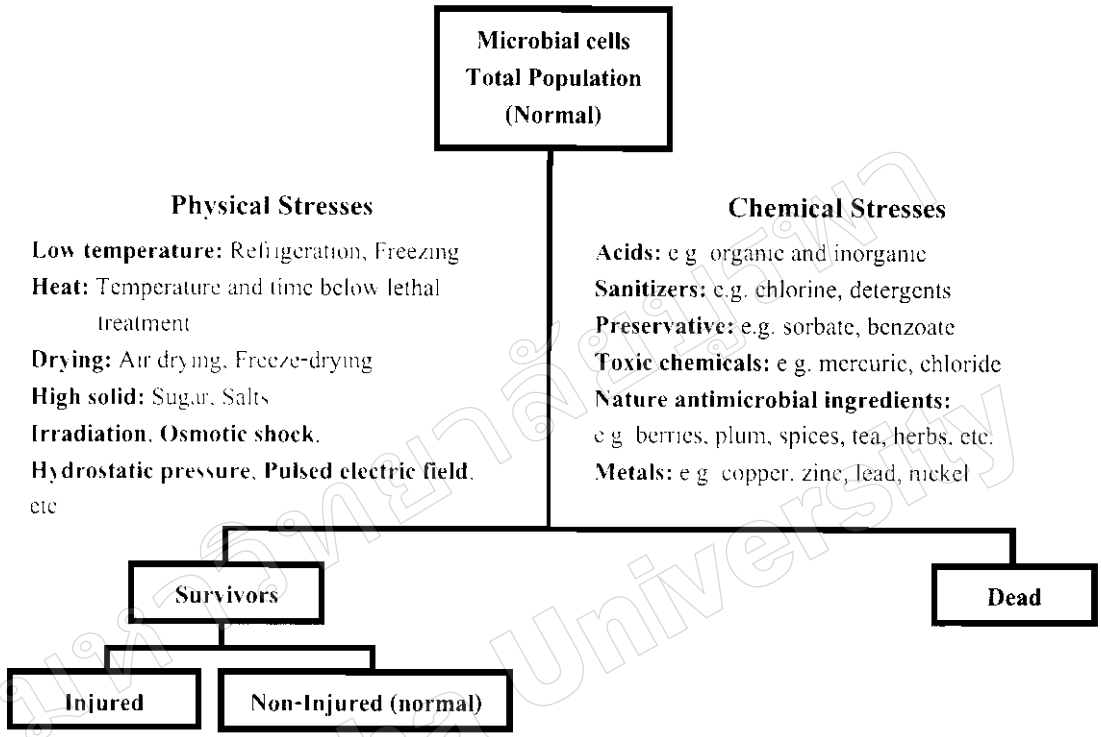
ในทางจุลชีววิทยา คำว่า "Viability" ของเชื้อจุลินทรีย์ หมายถึง ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการเพิ่มจำนวนหรือแบ่งเซลล์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะแสดงให้เห็นในรูปของโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือความขุ่นที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว ในทางตรงกันข้ามคำว่า "Lethal Injury" หรือ "Death" จึงหมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บหรือถูกทำลายจนไม่สามารถฟื้นคืนสภาพหรือเพิ่มจำนวนหรือแบ่งเซลล์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อถึงแม้ว่าจะมีการเลี้ยงในอาหาร Minimum Medium ก็ตาม ดังนั้นคำว่า "Sublethal Injury" ก็จะหมายถึง เชื้อที่บาดเจ็บจนทำให้หยุดการเจริญไปชั่วระยะเวลาหนึ่ง แต่จะสามารถฟื้นคืนชีวิตและเพิ่มจำนวนได้เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมนั่นเอง (Bernard, 2000; Ray & Speck, 1973)

กระบวนการผลิตอาหารต่าง ๆ ที่กล่าวไปแล้วข้างต้นนั้น จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับความเครียดหรือความกดดัน (Stress) ทั้งทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิต่ำ ความร้อน ความแห้ง แรงดันออสโมติก (Osmotic Presure) รวมถึงรังสี และทางเคมี เช่น กรด สารฆ่าเชื้อหรือสารกันเสีย เป็นต้น โดยปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารได้ 3 ลักษณะ คือ เชื้อจุลินทรีย์จะถูกทำลายหรือตาย (Killed or Lethal Cells) เชื้อจะมีชีวิตรอดปกติ (Survived But Non-Injured Cells) และเชื้อจะมีชีวิตรอดแต่เซลล์เกิดการบาดเจ็บ (Survived and Injured Cells or Sublethal Cells) และผลที่จะเกิดขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ก็จะแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับวิธีการหรือกระบวนการผลิตอาหาร (Wu, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 5

การบาดเจ็บและการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อาจเกิดขึ้นได้ในทุกกระบวนการผลิตอาหาร จากภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่ากระบวนการหรือวิธีการผลิตอาหารทุกวิธีจะทำให้เกิดผลต่อจุลินทรีย์ได้ทั้ง 3 แบบ เชื้อที่มีชีวิตเหลือรอดจากกระบวนการผลิตต่าง ๆ ในอาหารโดยเป็นเซลล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปกติที่ไม่บาดเจ็บ จะสามารถตรวจหาได้โดยใช้วิธีมาตรฐาน ซึ่งตามปกติมักจะต้องนำอาหารที่สำเร็จพร้อมจำหน่ายหรือบริโภค มาตรวจหาจุลินทรีย์ที่อาจก่อโรคในอาหาร (Wu, 2008)



ภาพที่ 5 ผลของกระบวนการผลิตอาหารต่อเชื้อจุลินทรีย์ (Wu, 2008)

2. ลักษณะสำคัญของเชื้อที่บาดเจ็บ

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการบาดเจ็บของเชื้อจุลินทรีย์สามารถเกิดได้จากกระบวนการผลิตอาหาร กรรมวิธีการผลิตอาหารที่แตกต่างกันก็มีผลกับองค์ประกอบของเซลล์ในตำแหน่งที่แตกต่างกันด้วย โดยพบว่าตำแหน่งที่เกิดการบาดเจ็บมักเป็นบริเวณที่สัมผัสความกดดันทางกายภาพหรือความกดดันทางเคมีโดยตรง เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่าเยื่อเลือกผ่าน (Permeability Barriers) ส่วนองค์ประกอบภายในของเซลล์ ที่มักเกิดการบาดเจ็บได้แก่ เอนไซม์ภายในเซลล์ ไรโบโซม (Ribosome) อาร์เอ็นเอ (RNA) และดีเอ็นเอ (DNA) เป็นต้น ซึ่งการบาดเจ็บที่ตำแหน่งเหล่านี้จะส่งผลให้เชื้อไวต่อสารเคมีและสารต้านจุลชีพ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด โดยเฉพาะอาหารที่ใช้ในการคัดแยก (Selective Media) จะมีผลทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเหล่านั้น และอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการ

ตรวจหาจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมาแล้ว (Wu, 2008) ลักษณะการบาดเจ็บของเชื้อที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันตามกระบวนการผลิตอาหารที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9 การบาดเจ็บของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการผลิตอาหาร (ดัดแปลงจาก Wu, 2008)

Injury	Treatments			
	Freezing	**Heating**	**Drying**	**Acidification**
A: Magnification of injury				
a. Loss of cellular materials	+	+	+	–
b. Sensitive to selective agents	+	+	+	+
c. Activation of some enzyme	+	+	+	+
B: Site of damage				
a. Some wall component	+	+	+	–
b. Cell membrane	+	+	+	–
c. Ribosome and ribosomal RNA	+	+	+	+ / –
d. Structural DNA	+	+	+	+

จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่ากระบวนการแช่เยือกแข็งจะทำให้เชื้อเกิดการบาดเจ็บโดยสูญเสียองค์ประกอบที่สำคัญบางอย่างของเซลล์ไป เช่น การรั่วของผนังเซลล์ มีผลทำให้เซลล์เกิดความไวต่อสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการคัดแยก (Selective Compounds) และอาจทำให้เอนไซม์บางชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้ ตำแหน่งของเซลล์ที่มักถูกทำลายจากการแช่เยือกแข็งมักจะอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรน ไรโบโซม หรือแม้แต่โครงสร้างของ DNA

โดยทั่วไปสามารถสรุปลักษณะที่สำคัญของเชื้อที่บาดเจ็บจากกระบวนการผลิตอาหารได้ คือ (1) เซลล์ที่บาดเจ็บจะมีความไวต่อสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการคัดแยกที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (2) ความไวนี้อาจเกิดจากการถูกทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (3) การบาดเจ็บนี้จะสามารถซ่อมแซมและกลับมาเป็นปกติได้ในอาหารที่ไม่มีสารที่มีคุณสมบัติในการคัดแยก (Selective Agents) ทำให้กลับมาทนทานต่อสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการคัดแยก และสามารถเพิ่มจำนวนได้ (4) เซลล์ที่บาดเจ็บ ไม่สามารถซ่อมแซมและเพิ่มจำนวนได้ในอาหารที่มีสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการคัดแยก (Restaino, Frampton, & Spitz, 2001)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 10 ลักษณะการบาดเจ็บของเซลล์จุลินทรีย์และสาเหตุของการบาดเจ็บ (Bernard, 2000)

Symptom of Injury	Suggested Cause of Injury
- Sensitivity to acid, alkali, osmotic stress and some inorganic ion (eg, selenite, copper) - Leakage of UV-absorbing meaterial	- **Cytoplasmic membrane damage**
- **Sensitivity to bile salts**, triphenyl methane dyes, hydrophobic antibiotics, lytic enzyme - Leakage of periplasmic enzymes	- **Damage to Gram-negative outer membrane or gram-positive surface protein layer**
- Sensitivity to oxidative stress	- Inactivation of catalase, superoxide dismutase - Increased metabolic production of H_2O_2 or O_2^- - Loss of cofactors for DNA repair enzymes - -- - Loss of intracellular reductants
- Altered nutritional requirements for growth (real or apparent)	- Enzyme inactivation (eg. peptidases) - Membrane damage leading to sensitivity to Cu or growth stimulation or inhibition by amino acids - Sensitivity to peroxide in rich media - Metabolic imbalance on nutritional upshift
- Altered metabolism	- Enzyme inactivation - Membrane damage leading to changes in enzyme / substrate accessibility
- Increased frequency of mutation	- Damage to DNA
- Restricted temperature range for growth - Increased sensitivity to secondary stress	- Imbalance between repair and degradative processes (?)
- Loss of virulence	- (?)
- Extended lag	- Need to resynthesize damaged membranes, nucleic acids, ribosomes, etc

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะการบาดเจ็บต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ของเชื้อที่แสดงให้เห็น สามารถอธิบายหรือคาดเดาได้ถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดบาดเจ็บ ซึ่งผลของการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นของเชื้อแต่ละชนิดจะคล้ายคลึงกันหากมีสาเหตุของการทำให้บาดเจ็บเหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ถ้าจุลินทรีย์ไวต่อกรด-ด่าง หรือสารอนินทรีย์บางชนิดเพิ่มขึ้น สามารถสันนิษฐานได้ว่าเชื้อเกิดการบาดเจ็บโดยถูกทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าไวต่อเกลือน้ำดี (Bile Salt) สีประเภทไตรฟีนิลมีเทน (Triphenyl Methane) ยาปฏิชีวนะประเภทไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic) หรือเกิดการรั่วไหลของเอนไซม์ภายในเซลล์ออกสู่นอกเซลล์ สาเหตุของการบาดเจ็บน่าจะเกิดจากการถูกทำลายชั้นเอาท์เทอร์เมมเบรน (Outer Membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ และโปรตีนที่ผิวชั้นนอก (Surface Protein Layer) ของแบคทีเรียแกรมบวก หรือถ้าอัตราการผ่าเหล่าเพิ่มสูงขึ้นคาดได้ว่าน่าจะเกิดจากการที่ ดีเอ็นเอถูกทำลาย เป็นต้น ซึ่งลักษณะการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นและปรากฏให้เห็น สามารถหาสาเหตุของความผิดปกติของเซลล์ได้ ตามตารางที่ 10

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการตาย การบาดเจ็บและการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากการแช่เยือกแข็งอาหาร (บุษกร อุตรภิชาติ. 2545)

จำนวนจุลินทรีย์จะลดลงอย่างมากในระหว่างเริ่มต้นการแช่เยือกแข็งอาหาร และจะค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง และเนื่องจากตัวถูกละลายในอาหารมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในบริเวณที่ยังไม่เป็นน้ำแข็ง (Unfrozen Portion) ทำให้ค่า a_w ของอาหารลดลงเมื่ออุณหภูมิยิ่งลดต่ำลงมากขึ้น จนทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง และมีตัวถูกละลายเข้มข้นมากขึ้นจนจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์จะหยุดการเจริญในที่สุด

มีปัจจัยหลายประการที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นตัวกำหนดว่า เหตุใดจุลินทรีย์บางชนิดจึงตาย บางชนิดรอดชีวิต และบางชนิดเกิดการบาดเจ็บ โดยปัจจัยที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากการแช่เยือกแข็ง มีดังนี้ (บุษกร อุตรภิชาติ. 2545; สุมาลี เหลืองสกุล, 2541; Barbara, 2000)

3.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะทนต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้ต่างกัน โดยพบว่าในระหว่างการแช่เยือกแข็งอาหาร จำนวนจุลินทรีย์ในอาหารค่อย ๆ ลดลง โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน (Douglas, 2004) แบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็งได้ดีกว่าแกรมลบ และจะรอดชีวิตในสภาพที่เย็นจัดมากกว่าในสภาพแช่เยือกแข็ง มีรายงานว่าการแช่เยือกแข็งสามารถทำลายเชื้อบางชนิดได้ดีกว่าการฉายรังสี เช่น *Yersinia enterocolitica* ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Non-Psychrophile) เมื่ออยู่ใน

ที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น การแช่เย็น เชื้อจะเจริญได้ช้าลง หรือแม้จะเป็นเชื้อกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) ก็ตาม หากอยู่ในอาหารแช่เยือกแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำมาก เซลล์จะได้รับบาดเจ็บหรือตาย และเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บอาจซ่อมแซมตัวเองใหม่ได้หากมีสภาวะที่เหมาะสม

3.2 อายุ จำนวน และสภาพของเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวน และตอนต้นของระยะเอ็กโพเนนเชียลของการเจริญเชื้อจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้น้อยกว่า ในตอนต้นของระยะพักตัวทำให้มีอัตราการตายมากกว่า ในส่วนสปอร์ของเซลล์จะทนทานมากกว่าเซลล์ปกติ โดยสปอร์ของเซลล์แบคทีเรียจะทนต่อการถูกทำลายด้วยการแช่เยือกแข็งมากที่สุด

3.3 การแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Berry et al., 2008)

อัตราเร็วของการทำความเย็น ในระหว่างการแช่เยือกแข็ง มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ เมื่ออุณหภูมิในเวลาเยือกแข็งลงอย่างช้า ๆ พบว่า น้ำภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ จะเริ่มกลายเป็นน้ำแข็ง และเกิดผลึกน้ำแข็ง ส่งผลให้ภายนอกเซลล์มีน้ำลดลง ทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกสู่นอกเซลล์ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาพลาสโมไลซิส (Plasmolysis) ยิ่งทำให้อุณหภูมิต่ำลงมากเท่าใด ยิ่งทำให้เซลล์สูญเสียน้ำมากขึ้นเท่านั้น และทำให้เซลล์ตายมากขึ้นตามไปด้วย ถึงแม้ว่า *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus* spp. จะรอดชีวิตได้ในระหว่างการแช่เยือกแข็ง แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวน หากเมื่อนำอาหารนั้นไปละลายน้ำแข็ง อาหารจะอุ่นขึ้นและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดและจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิต่ำ มีผลทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อาหารแช่เยือกแข็งที่ผ่านการละลายน้ำแข็งแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินไปจะเน่าเสียได้ง่ายกว่าอาหารสด การละลายน้ำแข็งในไก่สดแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วจะสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อได้ดีหากการละลายน้ำแข็งเป็นไปอย่างช้า ๆ จุลินทรีย์จะไม่เจริญในอาหารแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แต่เชื้อที่รอดชีวิตจะเพิ่มจำนวนในอาหารที่ไม่เป็นน้ำแข็ง หากมีการละลายน้ำแข็งอย่างช้า ๆ สปอร์จะงอกออกมาและเจริญได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายน้ำแข็ง เอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์ที่ตายแล้วจะมีผลทำให้คุณภาพของอาหารลดลง แบคทีเรียจะถูกทำลายลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -1 ถึง -5 องศาเซลเซียส เรียกช่วงนี้ว่า “ช่างวิกฤต” (Critical Zone) หากเป็นการแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็วจะผ่านช่วงเวลานี้ไปอย่างรวดเร็ว ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดมากขึ้น อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ปกติของเชื้อจุลินทรีย์จะตายหรือบาดเจ็บ การแช่เยือกแข็งจะทำลายอาหาร โดยผลึกน้ำแข็ง ทำให้สารอาหารหลุดออกมาจากเซลล์อาหาร ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในขณะละลายน้ำแข็งที่อยู่ในเซลล์อาหาร และการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็ง

จะทำให้เชื้อตายหรือบาดเจ็บมากขึ้น ซึ่งเกิดจากผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ทิ่มตำเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์ตายเนื่องจากเซลล์แตก แล้วปล่อยเอนไซม์ภายในเซลล์ออกมา ได้แก่ โปรติเนส และ ไลเปส จึงมีผลทำให้คุณภาพของอาหารลดลง

3.4 ระยะเวลาที่เก็บรักษาอาหารแช่เยือกแข็ง

จำนวนจุลินทรีย์ลดลงเมื่อเก็บอาหารแช่เยือกแข็งนานขึ้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการขาดแคลนอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีตัวอย่างการเก็บรักษาอาหารและปริมาณจุลินทรีย์ที่ลดลงเนื่องจากการเก็บรักษาที่นานขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การรอดชีวิตของเชื้อก่อโรคบางชนิดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -25.5 องศาเซลเซียส (Jay, 2000)

ชนิดของจุลินทรีย์	จำนวนแบคทีเรียที่นับได้ (x 10^5 /กรัม) หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลา (วัน)								
(*Salmonella* spp.)	0	2	5	9	14	28	50	92	270
S. Newington	75.5	56.0	27.0	21.7	11.1	11.1	3.2	5.0	2.2
S. Typhimurium	167.0	245.0	134.0	118.0	11.0	95.5	31.0	90.0	34.0
S. Typhi	128.5	45.5	21.8	17.3	10.6	4.5	2.6	2.3	0.86
S. Gallinarum	68.5	87.0	45.0	36.5	29.0	17.9	14.9	8.3	4.8
S. Anatum	100.0	79.0	55.0	52.5	33.5	29.4	22.6	16.2	4.2
S. Paratyphi B	23.0	205.0	118.0	93.0	92.0	42.8	24.3	38.8	19.0

3.5 องค์ประกอบของอาหาร และการมีสารป้องกันอันตรายของจุลินทรีย์จากความเย็น

ชนิดและส่วนประกอบของอาหาร มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในขณะแช่เยือกแข็ง หรือเก็บรักษา อาหารที่มีน้ำตาล เกลือ โปรตีน คอลลอยด์และไขมันสามารถป้องกันจุลินทรีย์ต่อการแช่เยือกแข็งได้ และตรงกันข้ามอาหารที่มีความชื้นสูงและมีค่าพีเอชต่ำ จะช่วยให้การทำลายเป็นไปได้เร็วยิ่งขึ้น ส่วนการเก็บรักษาจุลินทรีย์แบบแช่เยือกแข็ง มีการใส่สารป้องกันอันตรายแก่เซลล์จุลินทรีย์จากความเย็น (Cryoprotectant Agents) ในระหว่างการแช่เยือกแข็งกับการละลายน้ำแข็งสลับกันนั้น ชนิดของสารป้องกันอันตรายดังกล่าว เช่น กลีเซอรอล ไข่ขาว ไดเมธทิลซัลฟอกไซด์ คาร์โบไฮเดรต เปปไทด์ ซีรัมอัลบูมิน กรดมาลิก น้ำนม กรดกลูตามิก และไดเอธทิลไกลคอล เป็นต้น การใช้สารนี้อาจใช้สารใดสารหนึ่งเพียงสารเดียวหรืออาจใช้หลายสารร่วมกันก็ได้ กลีเซอรอลจะไปช่วยลดการทำลายของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ทวีน80 (Tween80)

จะช่วยป้องกันการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับกลีเซอรอลยังไม่ทราบกลไกการป้องกันเซลล์จุลินทรีย์อย่างชัดเจน แต่การใส่สารนี้จะไปลดการแตกหักของเยื่อหุ้มเซลล์

3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการที่ใช้ในการตรวจนับเซลล์ที่ยังมีชีวิต

เชื้อที่มีชีวิตรอดแต่ได้รับบาดเจ็บมักพบว่าเป็นปัญหาสำคัญในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับเซลล์จุลินทรีย์ จึงมีผลต่อการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ในบางครั้งไม่สามารถตรวจพบเชื้อในกลุ่มนี้บนอาหารบางชนิดได้ เช่นในอาหารที่มีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้คัดแยกเชื้อ ที่เฉพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งตามปกติเชื้อชนิดนั้นสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี จากความผิดปกติที่เกิดขึ้นนี้จึงเป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้ยังคงมีรายงานการเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหารนั่นเอง (Hara-Kudo et al., 2000) ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ในอาหารหลายรูปแบบ เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งเซลล์ปกติและเซลล์ที่บาดเจ็บ โดยมุ่งหวังให้เกิดความถูกต้องของชนิดและปริมาณของเชื้อที่ปนเปื้อนหรือเหลือรอดชีวิตในอาหาร ตัวอย่างของการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ โดยการใช้อาหารเหลวที่มีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้คัดแยกเชื้อ (Selective Enrichment Broths), ทินอาการ์เลเยอร์ (Thin Agar Layer; ใช้คำย่อ TAL), โฟร์คอมพาร์ทเมนท์ ทินอาการ์เลเยอร์ (Four Compartment Thin Agar Layer; ใช้ตัวย่อ 4-TAL) และอาการ์อันเดอร์เลย์ (Agar Underlay Method) เป็นต้น (Restaino et al., 2001; Wu, 2008)

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนซึ่งอยู่ในอาหารแช่เยือกแข็ง เมื่อนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะตรวจพบเชื้อกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง แต่กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญมากในอาหารแช่เยือกแข็งแต่ไม่สามารถเจริญได้ จึงควรบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิต่ำด้วย มีรายงานการศึกษาหลายฉบับชี้ให้เห็นถึงการตรวจหาเชื้อก่อโรค โดยพบว่าอาหารที่ผ่านการแปรรูป เช่น การให้ความร้อน การทำแห้ง หรือการแช่เยือกแข็ง เมื่อใช้วิธีมาตรฐานจะสามารถตรวจพบแต่เชื้อปกติที่มีชีวิต แต่เชื้อก่อโรคบางชนิดที่บาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่สามารถตรวจพบได้ จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการฟื้นคืนชีวิต (Recovery) ของเซลล์ที่บาดเจ็บก่อน จึงจะสามารถตรวจพบได้จากวิธีมาตรฐาน เช่น การใช้อาหารที่มีไม่เติมสารยับยั้งในการซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บก่อนการใช้อาหารที่มีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้คัดแยกเชื้อ หรือแม้กระทั่งการพัฒนาเทคนิคที่ช่วยในการฟื้นคืนชีวิตของเชื้อ เช่น การใช้อาหารแข็ง TAL หรือ 4-TAL เป็นต้น (Wu, 2008)

วิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง

1. การตรวจหา *S. aureus*

S. aureus ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียประจำถิ่น (Background Flora) ในวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้ แต่เมื่อวัตถุดิบผ่านการแปรรูป จุลินทรีย์ชนิดอื่นถูกทำลายลงเป็นส่วนใหญ่ *S. aureus* จะสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นแข่งขัน (Doyle et al., 1997)

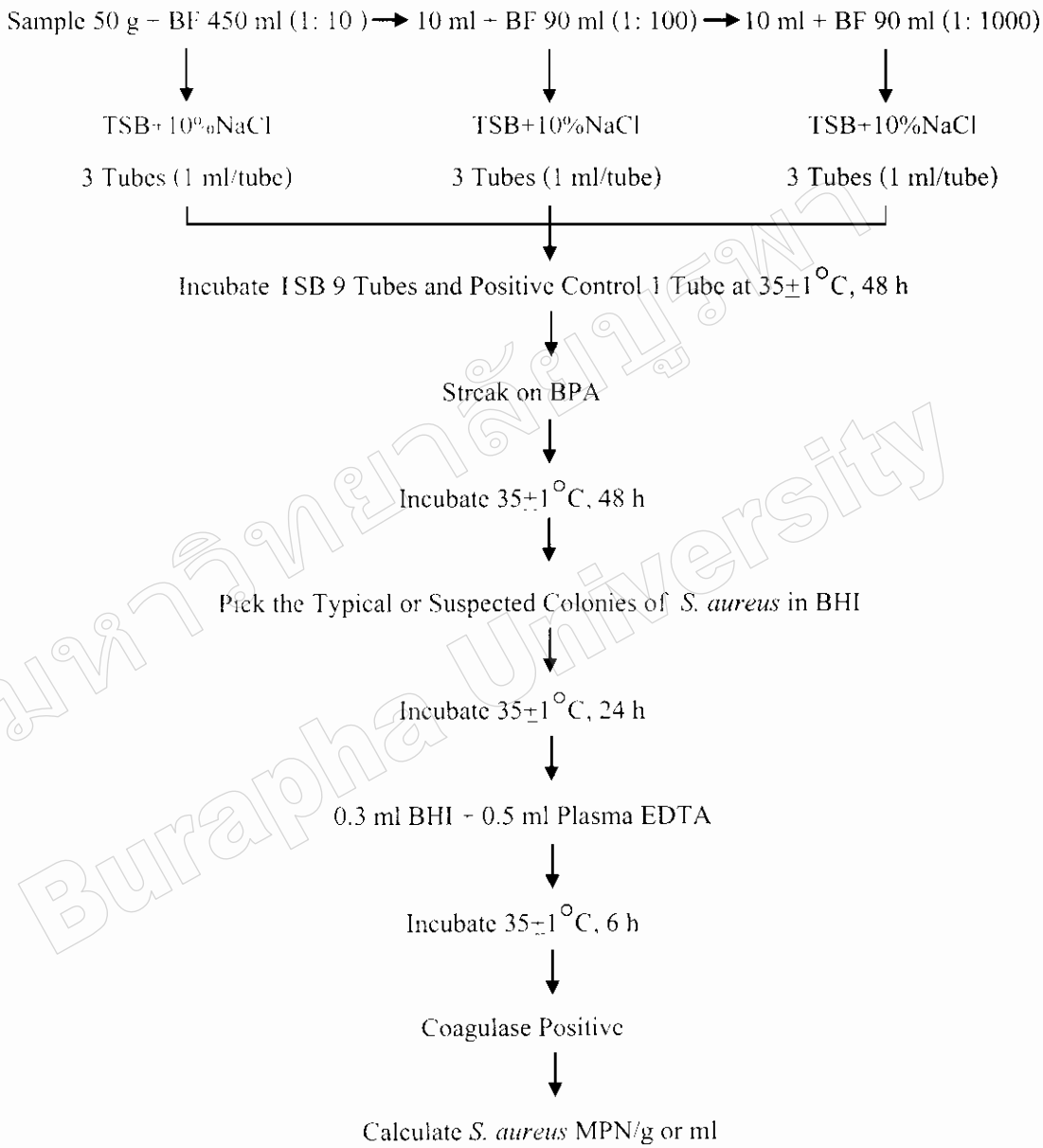
ลักษณะสำคัญบางประการที่สามารถใช้ตรวจหา *S. aureus* ได้แก่ การเจริญในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 สภาพที่มีลิเทียมคลอไรด์ (Lithium Chloride) ความเข้มร้อยละ 0.5 หรือสภาพที่มีโพแทสเซียมเทลลูไรท์ (Potassium Tellurite, K_2TeO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 การหมักแมนนิทอลในสภาพไร้ออกซิเจน การรีดิวซ์เทลลูไรท์ให้สีดำ การไฮโดรไลส์ไข่แดง เนื่องจากเชื้อสร้างเอนไซม์เลซิทิเนส รวมทั้งสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส ลักษณะบางอย่างดังกล่าวได้นำมาใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* เช่น Baird-Parker Medium (BPA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทที่ใช้คัดแยกความแตกต่างของเชื้อที่สามารถเจริญได้โดยเฉพาะ (Selective Differential Medium) ที่มักใช้ในการแยกเชื้อ *S. aureus* การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส เป็นการทดสอบที่มักใช้เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่แยกจากอาหาร BPA เป็น *S. aureus* (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549)

1.1 การตรวจหา *S. aureus* โดยวิธีมาตรฐาน (FDA, 2001)

โดยปกติวิธีวิเคราะห์มาตรฐานจะถูกนำมาใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารที่ต้องได้รับการรับรองความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยพบว่าวิธีมาตรฐานที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหา *S. aureus* ในอาหาร คือ วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานของ FDA (Bacteriological Analytical Manual) ซึ่งใช้เทคนิคเอ็มพีเอ็น (Most Probable Number; MPN) โดยเตรียมตัวอย่างและทำการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water; BF แบบ 10 เท่า (10-Fold Dilution) และถ่ายตัวอย่างลงในอาหารเหลว TSB ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 10 (TSB–10%NaCl) ถ่ายเชื้อลงในอาหารแข็งเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก *S. aureus* คือ BPA ซึ่งจะแสดงลักษณะโคโลนีที่สำคัญของ *S. aureus* และนำไปตรวจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส โดยใช้พลาสมา ที่เติม EDTA ในการทดสอบ โดยมีขั้นตอนดังภาพที่ 6

Flow Chart for *S. aureus* by MPN Technique (MPN/g or ml)

(BAM Online 2001, C 12)



ภาพที่ 6 แผนภูมิการวิเคราะห์ *S. aureus* ในอาหารโดยใช้เทคนิคเอ็มพีเอ็น (ดัดแปลงจาก FDA, 2001)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 การตรวจหา *S. aureus* ที่บาดเจ็บ

จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บและมีชีวิตรอดในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิต มักไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีที่เฉพาะต่อการเจริญ เนื่องจากความผิดปกติขององค์ประกอบเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งจะต้องซ่อมแซมหรือทำให้ฟื้นคืนชีวิตโดยใช้อาหารที่ไม่เติมสารยับยั้งก่อน โดยทั่วไปพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มักใช้ในการซ่อมแซม *S. aureus* ที่เกิดการบาดเจ็บ คือ Tryptic Soy Broth (TSB) หรือ TSB ที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.5 และเมื่อเซลล์ถูกซ่อมแซมจนเป็นปกติแล้วจึงนำมาเลี้ยงต่อในอาหารที่มีสารอาหารเฉพาะ เช่น Baird-Parker Agar (BPA) เพื่อหาปริมาณ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร (อดิศร เสวตวิวัฒน์, ชญากานต์ มะลิวัลย์ และณัฐนิช กิตติก้องนภางค์, 2540) ลักษณะโคโลนีที่สำคัญของ *S. aureus* ที่พบบนอาหาร BPA คือ โคโลนีมีสีเทาดำเนื่องการรีดิวซ์เทลลูไรส์ในอาหาร และเกิดโซนสีขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการสร้างเอ็นไซม์เลซิทิเนสออกมาย่อยไข่แดงในอาหาร (FDA, 2001)

2. การตรวจหา *Salmonella* spp.

การตรวจหา *Salmonella* ที่ได้ผลเชื่อถือได้ ขึ้นอยู่กับแผนการสุ่มตัวอย่างที่ดีและการใช้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากในอาหารมักมี *Salmonella* จำนวนน้อยและบ่อยครั้งที่เชื้อชนิดนี้มักเผชิญกับสภาวะเครียดในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนการส่งเสริมการเจริญ (Pre-Enrichment) เพื่อให้ทำให้เซลล์ของ *Salmonella* ที่บาดเจ็บฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรง เจริญและเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ตรวจพบได้ ในขั้นนี้จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ไม่เติมสารยับยั้ง (Non-Selective Broth) จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก (Selective Enrichment Broth) ตามด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อที่เจริญได้ต่างกัน เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Salmonella* spp. ขั้นต่อไปจึงทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical Screening) และทดสอบยืนยันทางน้ำเหลืองวิทยา (Serological Confirmation) (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549)

2.1 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยวิธีมาตรฐาน (International Organization for Standardization [ISO], 2002)

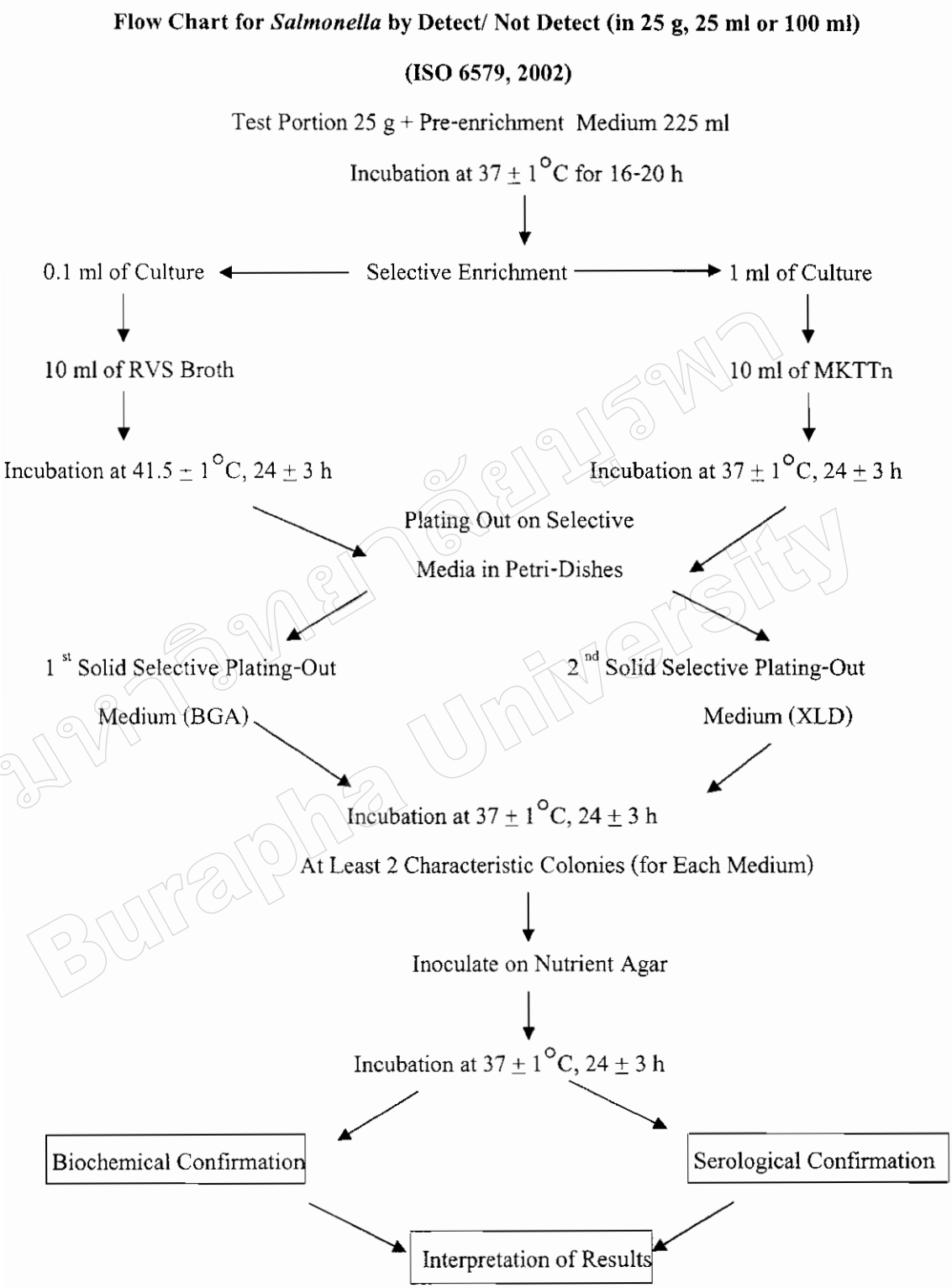
วิธีมาตรฐานที่ทุกหน่วยงานในประเทศให้การยอมรับและเชื่อถือในการตรวจวิเคราะห์หา *Salmonella* spp. ในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิต คือ วิธีทดสอบตามมาตรฐาน ISO 6579 โดยวิธีการตรวจหา *Salmonella* spp. สามารถสรุปได้ 4 ขั้น คือ 1) Pre-Enrichment โดยใช้อาหารเหลว Buffered Peptone Water: BPW เพื่อเพิ่มปริมาณและฟื้นคืนสภาพของ *Salmonella* spp. ให้สามารถตรวจพบได้ง่ายขึ้น 2) Selective Enrichment โดยใช้อาหารเหลวที่มีสารเฉพาะในการคัดแยก 2 ชนิดคือ Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth; MKTTn และ Rappaport

Vassiliadis Soya Broth: RVS โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อส่งเสริมการเจริญของ *Salmonella* spp. และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร 3) Plating-Out and Identification โดยใช้อาหารแข็งที่มีสารเฉพาะในการคัดแยก 2 ชนิด คือ Brilliant Green Agar Modified (BGA) และ Xylose Lysine Deoxycholate Agar Base (XLD) ในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกให้เหลือเฉพาะ *Salmonella* spp. และ 4) Confirmation โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี จำนวน 6 รายการ ได้แก่ อาหาร Tryptone broth (TB) Triple Sugar Iron Agar (TSI) L-Lysine Decarboxylation Medium (L-Ly) MR-VP Medium (MR-VP) Urea Agar (UA) และ ONPG Disc Solution แล้วจึงทดสอบน้ำเหลืองวิทยาตามขั้นตอนในภาพที่ 7

2.2 การตรวจหา *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บ

Salmonella spp. ที่บาดเจ็บจากกระบวนการผลิตอาหารมีคุณสมบัติคล้ายกันกับ *S. aureus* คือ มักไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีเฉพาะ เนื่องจากความผิดปกติขององค์ประกอบเซลล์ที่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งจะต้องซ่อมแซมหรือทำให้ฟื้นคืนชีวิตโดยใช้อาหารที่ไม่เติมสารยับยั้ง เช่น Buffer Peptone Water (BPW) ซึ่งพบว่าสามารถช่วยฟื้นสภาพเซลล์ที่บาดเจ็บได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบจะไวต่อการแช่เยือกแข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Barbara, 2000; Thushani, Ariyawansa, & Arampath, 2003) เมื่อทำให้เซลล์ฟื้นสภาพแล้วจึงจะนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้คัดเลือก ก่อนจะนำไปยืนยันผลการทดสอบด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี และน้ำเหลืองวิทยา

ในปัจจุบันมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยลดระยะเวลาและขั้นตอนในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารทั้งที่บาดเจ็บและเซลล์ปกติ เช่น อาหารแข็ง TAL ซึ่งพบว่าสามารถตรวจหา *Salmonella* spp. ได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐานปกติ (Wu, 2008)



ภาพที่ 7 แผนภูมิการวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในอาหาร (ดัดแปลงจาก ISO, 2002)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ (2540) ศึกษาความเข้มข้นของเกลือในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีผลต่อการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *S. aureus* ในไอศกรีมกะทิแช่เยือกแข็ง โดยเปรียบเทียบการใช้ TSB ที่มีเกลืออยู่ร้อยละ 0.5 (0.5 % NaCl TSB) และ TSB ที่เพิ่มปริมาณเกลือสูงถึงร้อยละ 10 (10 % NaCl TSB) ในการตรวจหา *S. aureus* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น จากตัวอย่างไอศกรีมกะทิแช่เยือกแข็งทั้งที่ปนเปื้อนในขณะทำการผลิตและจากที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ลงในตัวอย่าง พบว่าการใช้ 0.5 % NaCl TSB ให้ผลการตรวจพบปริมาณเชื้อมากกว่า 10 % NaCl TSB อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการแช่เยือกแข็งไอศกรีมกะทิมีผลทำให้เซลล์ของ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เกิดการบาดเจ็บหลังการผลิตสูงถึงร้อยละ 60.7 และมีปริมาณเซลล์ที่บาดเจ็บเพิ่มขึ้นร้อยละ 73.1-79.9 เมื่อทำการเก็บรักษาผลิตแช่แข็งดังกล่าวเป็นเวลา 8 วัน การใช้อาหารเหลว TSB ที่มีความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการฟื้นตัวของเซลล์ที่บาดเจ็บเหล่านี้เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็งนี้

Foley and Sheuring (n.d.) ศึกษาอัตราการทำลายจุลินทรีย์ในไอศกรีมระหว่างแช่เยือกแข็ง โดยศึกษาอัตราการตายของ *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. aureus*, *Saccharomyces lactis* และสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ในไอศกรีมระหว่างการแช่เยือกแข็ง 30 นาที ซึ่งเติมเชื้อที่ผสมทั้งหมดลงในไอศกรีม พบว่ากราฟอัตราการทำลายของจำนวนเชื้อต่อเวลาของ *E. coli*, *P. fluorescens* และ *S. lactis* ไม่เป็นเส้นตรงแต่ลักษณะกราฟคล้ายคลึงกัน ส่วน *S. aureus* ให้กราฟที่แสดงถึงความสามารถในการต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งได้ดี ในขณะที่การแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อสปอร์ของ *B. subtilis* การวิเคราะห์ทางสถิติชี้ให้เห็นถึงอัตราการตายโดยเฉลี่ยของจุลินทรีย์และรูปร่างของกราฟอัตราการทำลาย อัตราการแช่เยือกแข็งมีอิทธิพลต่อรูปร่างของกราฟอัตราการทำลาย และอัตราการตายของ *E. coli* และพบว่าเซลล์ของ *E. coli* ที่มีอายุน้อย จะมีความไวต่อการถูกทำลายมากกว่าเซลล์ที่มีอายุมากกว่า

Iandolo and Ordel (1966) ศึกษาการซ่อมแซม *S. aureus* ที่บาดเจ็บจากการใช้ความร้อน ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้ *S. aureus* MF31 ทำให้บาดเจ็บโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า มากกว่าร้อยละ 99 ของเชื้อที่มีชีวิตเจริญได้ลดลงในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 7.5 จากข้อมูลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นถึงเซลล์ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อน เกิดความเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และมีผลทำให้เกิดการรั่วไหลที่บริเวณดังกล่าว เมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีการจำกัด การฟื้นคืนชีวิตอย่างสมบูรณ์จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ อุณหภูมิและพีเอชที่

เหมาะสมจะช่วยในการฟื้นคืนชีวิตของ *S. aureus* MF31 ได้เป็นอย่างดี ความต้องการสารอาหารที่ทำให้เซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บสามารถฟื้นคืนชีวิตได้อย่างสมบูรณ์จะต้องใช้อาหารที่ประกอบด้วยแหล่งของพลังงาน ได้แก่ กลูโคส กรดอะมิโนที่จำเป็น และฟอสเฟต เป็นต้น การใช้สารยับยั้งการเจริญบางชนิด ได้แก่ เพนนิซิลิน (Penicillin) ไซโคลเซอรีน (Cycloserine) และคลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol) ไม่สามารถยับยั้งการฟื้นคืนชีวิตของแบคทีเรียได้ แต่การใช้ แอคติโนมัยซิน (Actinomycin) สามารถยับยั้งการฟื้นคืนชีวิตได้อย่างสมบูรณ์ จากผลการทดลองนี้สามารถคาดเดาได้ว่าการบาดเจ็บของ *S. aureus* MF31 จากการใช้ความร้อนเป็นผลมาจากการความผิดปกติของการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอนั่นเอง

Sorrells, Speck, and Warren (1970) ศึกษาการก่อโรคของ *Salmonella* Gallinarum หลังจากการบาดเจ็บโดยการแช่เยือกแข็ง พบว่าการแช่เยือกแข็งสารละลายเซลล์ของ *S.* Gallinarum ที่อุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นผลให้จำนวนเซลล์บางเซลล์ตาย บางเซลล์บาดเจ็บ และบางเซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เซลล์ที่บาดเจ็บมีประมาณร้อยละ 40 และพบว่าสามารถมีชีวิตรอดได้จากการแช่แข็งและเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 วัน การก่อโรคของ *S.* Gallinarum จะสังเกตได้จากการตายของลูกไก่หลังจากที่ถูกฉีดสารละลายเชื้อที่ไม่บาดเจ็บและบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง ซึ่งปรากฏว่ายังคงมีลูกไก่ตายจากเซลล์ของ *S.* Gallinarum ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งโดยเกิดขึ้นได้เหมือนกับเซลล์ปกติ

Wilson and Davies (1976) ศึกษาปริมาณสารอาหารที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในการฟื้นคืนชีวิตของ *Salmonella* Senftenberg 4969 ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ศึกษาโดยนำ *S.* Senftenberg 4969 ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อน ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง Trypticase Soy Yeast Extract เปรียบเทียบกับ อาหารแข็ง Minimal Medium (M9) หลังจากที่นำไปบ่มในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนสามารถซ่อมแซมและฟื้นคืนชีวิตได้ในอาหาร M9 ดีกว่าในอาหารที่ส่งเสริมการเจริญ และพบว่าอาหาร M9 ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนได้ดีกว่าอาหารเหลว Lactose Broth

Smith and Palumbo (1978) ศึกษาการบาดเจ็บของ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างการทำไส้กรอกหมัก โดยเติม *S. aureus* 196E ลงในไส้กรอกวัวที่เติมน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 0.5-2.0 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า *S. aureus* 196E ไม่สามารถเจริญได้ในอาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7.5 การบาดเจ็บของเซลล์เกิดขึ้นจากกรดแลคติกที่ผลิตได้

ในระหว่างการหมักไส้กรอก และเมื่อนำไส้กรอกที่ปนเปื้อน *S. aureus* 196E ที่บาดเจ็บจากการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และนำไปนับจำนวนในอาหารแข็ง TSA (นับเชื้อทั้งที่บาดเจ็บและไม่บาดเจ็บ) กับอาหารแข็ง TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 7.5 (นับจำนวนเชื้อที่ไม่บาดเจ็บ) พบว่า *S. aureus* 196E ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 7.5 เช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการตรวจหาและนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตของ *S. aureus* 196E ในไส้กรอกหมักได้อย่างถูกต้อง

Sheridan (1997) ศึกษาผลของการแช่เยือกแข็งต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อที่ต่างชนิดกันและมีอัตราส่วนไขมันที่ต่างกัน โดยศึกษาการรอดชีวิตของ *Salmonella* Kentucky และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อวัวสับที่มีปริมาณไขมันร้อยละ 5, 10, 20, 30 และ 50 แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส มากกว่า 10 สัปดาห์ พบว่า การรอดชีวิตของแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณไขมันเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 20 หรือ 30 ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เมื่อนำเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อแกะสับ ที่เติมแบคทีเรียทั้งสองชนิด ไปแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส มากกว่า 10 สัปดาห์ แบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดสามารถรอดชีวิตได้ในปริมาณที่ต่างกัน ในชนิดของเนื้อที่แตกต่างกันด้วย โดยสามารถรอดชีวิตได้ปริมาณสูงสุดในเนื้อหมู เนื้อแกะ และในเนื้อวัวมีปริมาณการรอดชีวิตต่ำที่สุด ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตได้ในเนื้อแช่แข็งที่แตกต่างกัน คือชนิดของเนื้อสัตว์ที่แตกต่างกัน อัตราส่วนปริมาณไขมันที่แตกต่างกัน ซึ่งไขมันสามารถป้องกันการทำลายของแบคทีเรียในเนื้อแช่แข็งได้ โดยไขมันมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการเยือกแข็ง (Cryoprotective Agents)

Jeffreys, Hak, Steffan, Foster, and Bej (1998) ศึกษาถึงการเจริญ การรอดชีวิต และลักษณะที่สำคัญของยีน *cspA* ใน *Salmonella* Enteritidis ที่เกิดจากการช็อคด้วยความเย็น โดยอธิบายถึง *S.* Enteritidis ว่าเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการก่อโรคและทำให้เกิดความเจ็บป่วยจากการบริโภคอาหาร ซึ่งสามารถเจริญและมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิต่ำได้เป็นระยะเวลานาน จะพบการรอดชีวิตของ *S.* Enteritidis เพิ่มมากขึ้น หากนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10°C ก่อนการแช่เยือกแข็ง เนื่องจากพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน CS7.4 ที่มีน้ำหนัก 7.4 kDa ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ Cold Shock Protein และมีการแสดงออกของยีน *cspA* เกิดขึ้น และ CS7.4 จะช่วยในการป้องกันการทำลายเซลล์จากอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง แต่ผลของการศึกษาก็ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก

Hara-Kudo et al. (2000) ศึกษาถึงการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญในขั้นตอนของการฟื้นคืนชีวิตในการตรวจหา *Escherichia coli* O157: H7 ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งในตัวอย่างอาหาร 11 ชนิด โดยเติมเชื้อ *E. coli* O157: H7 ลงในตัวอย่างอาหารและนำไปเก็บรักษาในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นับจำนวนเชื้อที่บาดเจ็บและไม่บาดเจ็บโดยใช้อาหารแข็ง TSA และ sMac (Sobital MacConkey) ที่เติมเซฟิกซีม (Cefixime) และโพแทสเซียมเทลลูไรท์ พบว่าเซลล์ของ *E. coli* O157: H7 เกิดการบาดเจ็บเป็นจำนวนมากในตัวอย่าง กะหล่ำดอง หัวไชเท้าเส้น สาหร่ายและมะเขือเทศแช่เยือกแข็ง และในการตรวจหา *E. coli* O157: H7 ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งในตัวอย่างอาหารพบว่าแบคทีเรียสามารถฟื้นคืนชีวิตได้หลังจากที่นำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเหลวโมดิฟายด์ อีโคไล (Modified *E. coli* Broth) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเกลือน้ำดี และโนโวไบโอซิน (Novobiocin) เพื่อให้อาหารมีความเฉพาะต่อเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ต่ออีก 18 ชั่วโมง จากการทดสอบ พบว่าวิธีการฟื้นคืนชีวิตที่อธิบายมาก่อนหน้านี้ให้ผลในการฟื้นคืนชีวิตของ *E. coli* O157: H7 ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งได้ดีกว่าการใช้อาหารเหลวสำหรับคัดแยกเชื้อและส่งเสริมการเจริญ ที่เติมสารที่เฉพาะต่อการเจริญลงไปในอาหารพร้อมกันทั้งหมด

Kang and Fung (2000) ศึกษาการประยุกต์ใช้วิธี Thin Agar Layer (TAL) ในการฟื้นคืนชีวิตของ *Salmonella* Typhimurium ที่บาดเจ็บ โดยพบว่าตามปกติจะใช้อาหาร Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) ในการตรวจหา *Salmonella* แต่ XLD จะยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อน ในขณะที่อาหารแข็ง TSA ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่เติมสารยับยั้งสามารถตรวจหา *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการใช้ TAL ในการตรวจหาและนับจำนวน *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บ ซึ่งเตรียมได้จากการเทอาหารแข็ง XLD ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและปล่อยให้แข็ง แล้วจึงเทอาหารแข็ง TSA ประมาณ 14 มิลลิลิตร ทับลงบน XLD ที่แข็งแล้ว จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงเชื้อ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนลงบนอาหารดังกล่าวและนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ประมาณ 2-3 ชั่วโมง พบว่า เชื้อจะซ่อมแซมบริเวณที่บาดเจ็บและเริ่มเจริญเพิ่มขึ้นบนอาหาร TSA ในระหว่างนั้น สารที่เป็นองค์ประกอบเฉพาะในอาหารแข็ง XLD จะแพร่ผ่านไปที่ชั้นของอาหาร TSA จากนั้น *S.* Typhimurium จะเริ่มสร้างลักษณะเฉพาะของโคโลนี (โคโลนีสีดำ) บนอาหาร TSA และพบว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากถูกยับยั้งโดยสารที่อยู่ใน XLD และพบว่าอัตราการฟื้นคืนชีวิตของ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนในอาหาร TAL ที่พัฒนาขึ้นมาแตกต่างจากการฟื้นคืนชีวิตบนอาหาร XLD เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P, 0.05)

Restaino et al. (2001) ศึกษาการซ่อมแซมและการเจริญของ *Escherichia coli* O157: H7 จากการบาดเจ็บโดยการให้ความร้อนและการแช่เยือกแข็ง โดยใช้อาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญและมีองค์ประกอบเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อ โดยทำให้ *E. coli* O157: H7 บาดเจ็บจากการให้ความร้อนที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที (พบเชื้อบาดเจ็บประมาณ 1.5-2.0 Log_{10}) และทำให้บาดเจ็บจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน (บาดเจ็บประมาณ 1.0 Log_{10}) จากนั้นนำไปซ่อมแซมและฟื้นคืนชีวิตโดยเลี้ยงในอาหารที่ส่งเสริมการเจริญ 5 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว Buffer Peptone Water ที่เติมแวนโคมัยซิน (Vancomycin) เซฟโซลูดิน (Cefsulodin) และเซฟิกซีม (BPW+VCC) อาหารเหลว Modified EC ที่เติมโนโวไบโอซิน (mEC+n), อาหารเหลว Enterohaemorrhagic *E. coli* (EEB), อาหารเหลว Double Modified TSB (dmTSB) และ อาหารเหลว BCM® *E.coli* (BCM®-EB) เปรียบเทียบกับการใช้ TSB เป็นอาหารที่ไม่เติมสารยับยั้ง (Non-Selective Media) บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจผลการซ่อมแซมโดยนับจำนวนบนอาหารแข็ง MacConkey ที่เติมเกลือน้ำดีร้อยละ 0.6 (Mac-BS) กับอาหารแข็ง Brian Heart Infusion (BHI) พบว่าในอาหารเหลว mEC+n, EEB และ dmTSB เซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่แข็งและให้ความร้อนบางเซลล์ตาย (การลดลงในอาหาร BHI) ส่วนในการซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อน สามารถทำได้ในอาหารเหลว BPW+VCC และ BCM®-EB ส่วนเซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งพบการซ่อมแซมเกิดขึ้นได้ในอาหาร BCM®-EB เท่านั้นโดยให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับการใช้ TSB ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่เติมสารยับยั้ง

Thushani et al. (2003) ศึกษาการฟื้นคืนชีวิตของ *Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus* ที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งกุ้ง โดยแบ่งกุ้งสับที่ปราศจากเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะเติมแบคทีเรียแต่ละชนิดแยกกัน นำไปแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส พบว่า *S.* Typhimurium จะมีจำนวนลดลงมากกว่า 3 Log_{10} หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วน *S. aureus* พบว่ามีจำนวนลดลงประมาณ 2 Log_{10} เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลาและอุณหภูมิเท่ากับ *S.* Typhimurium และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA เป็นอาหารแข็งที่มีคุณสมบัติในการช่วยฟื้นคืนชีวิตของเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บ สรุปได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถมีชีวิตรอดในกุ้งแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส มากกว่า 8 สัปดาห์ *S. aureus* สามารถต้านทานต่อการแช่เยือกแข็งได้ดีกว่า *S.* Typhimurium ทำให้มีจำนวนเซลล์เหลือรอดชีวิตมากกว่า และการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นผลทำให้ตระหนักถึงความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ความถูกต้องของการตรวจหาเชื้อที่บาดเจ็บและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Validation Method)

Bangtrakulnonth, Pornrungwong, Pulsrikarn, Boonmar, and Yamaguchi (2006) ศึกษาการฟื้นคืนชีวิตของ *Salmonella* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อในประเทศไทย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดแยกและส่งเสริมการเจริญของเชื้อ ร่วมกับการต้านทานต่อสารต้านจุลินทรีย์ ทำการศึกษาในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อ 50 ตัวอย่าง ที่มีและไม่มีการลงทะเบียน (ประกอบด้วย เนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว) ที่ซื้อจากตลาดและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพฯ นำแต่ละตัวอย่างมาตรวจหาจำนวน *Salmonella* spp. โดยวิธีปกติมาตรฐาน (Conventional Method) ซึ่งใช้อาหารที่มีองค์ประกอบเฉพาะในการคัดแยกและส่งเสริมการเจริญ 2 ชนิด คือ อาหารเหลว RVS และอาหารแข็ง MSRV เปรียบเทียบกับการใช้อาหารที่พัฒนาขึ้น โดยมีองค์ประกอบเฉพาะในการคัดแยกและส่งเสริมการเจริญเพียง 1 ชนิด คือ DIASALM จากการศึกษา พบว่าการใช้อาหาร RVS และ MSRV ให้ผลในการตรวจหา *Salmonella* spp. ได้ดีกว่าการใช้ DIASALM เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Salmonella* spp. ที่บาดเจ็บมีการฟื้นคืนสภาพและเจริญในอาหาร RVS และ MSRV

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University