ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ จากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

CONTAMINATION OF MICROBIALS ON FIVE AQUATIC PRODUCTS FROM CULTURE

โดย

นางสาวสกุลทิพย์ พุทธแก้ว

รหัส 5007201029

สาขาวิชาการประมง

มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2551

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ จากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

CONTAMINATION OF MICROBIALS ON FIVE AQUATIC PRODUCTS FROM CULTURE

โดย

นางสาวสกุลทิพย์ พุทธแก้ว

รหัส 5007201029

สาขาวิชาการประมง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2551

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ
จากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

CONTAMINATION OF MICROBIALS ON FIVE AQUATIC
PRODUCTS FROM CULTURE

ได้พิจารณาและเห็นชอบโดย

.....	อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ
(อาจารย์นาตาลี อาร์ ใจเย็น)	วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ (ร่วม)
(อาจารย์วีรชัย เพชรสุทธิ์)	วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง : การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

: CONTAMINATION OF MICROBIALS ON FIVE AQUATIC PRODUCTS FROM CULTURE

ชื่อผู้เขียน : นางสาวสกุลทิพย์ พุทธแก้ว

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการประมง

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์นาตาลี อาร์ ใจเย็น

บทคัดย่อ

ศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์จากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิดคือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา สุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งในเขต 7 จังหวัดภาคใต้ตอนบนได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชุมพร ระนอง พังงา ภูเก็ต และกระบี่ พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ศึกษา โดยพบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในหอยสูงสุดคิดเป็น 9.57 รองลงมาคือปู กุ้ง ปลา และหมึก คิดเป็น 3.21, 0.44, 0.27 และ 0.24 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio cholerae* พบปนเปื้อนสูงสุดในกุ้งคิดเป็น 5.34 รองลงมาคือ ปู หมึก ปลา และหอย คิดเป็น 1.69 , 1.57 , 1.36 และ 0.78 ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียก่อโรค ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง การปนเปื้อน

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์นาตาลี อาร์ ใจเย็น ซึ่งได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษให้แก่ข้าพเจ้า และได้ให้คำแนะนำในการรวบรวมข้อมูล แนวทางในการวิเคราะห์ข้อมูล การเขียนรายงาน และช่วยตรวจสอบแก้ไขจนกระทั่งสำเร็จออกมาเป็นรูปเล่มปัญหาพิเศษอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์วีรชัย เพชรสุทธิ์ ที่เป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือให้คำแนะนำในการเขียนรายงานด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณ คุณธีรยา สรรพวรพงษ์ นักวิชาการผลิตภัณฑ์อาหารชำนาญการ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและเจ้าที่ฝ่ายจัดการตัวอย่างและออกเอกสารใบรับรองศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานีทุกท่านที่ช่วยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างและบันทึกข้อมูล ตลอดจนเพื่อนๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้า นายวิศษฏ์ พุทธแก้วและนางสุภาพร แก้วดวงแข ที่สนับสนุนในการศึกษาเล่าเรียน และขอขอบคุณทุกๆ คนในครอบครัวที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

สกุลทิพย์ พุทธแก้ว

กันยายน 2552

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
กิตติกรรมประกาศ	(ข)
สารบัญ	(ค)
สารบัญตาราง	(ง)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 เวลาและสถานที่	8
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา	8
บทที่ 4 ผลการศึกษา	18
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	23
ข้อเสนอแนะ	23
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	29
ภาคผนวก (ก) วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	30
ภาคผนวก (ข) ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แผนดำเนินการทดลอง	8
2	ปริมาณตัวอย่างการตรวจพบและไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค กลุ่ม *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง	18
3	ปริมาณตัวอย่างการตรวจพบและไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค กลุ่ม *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง	20

ตารางผนวกที่

1	แสดงค่า ข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ของปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp.	29
2	แสดงค่า ข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ของปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Vibrio cholerae*	30

บทที่1
บทนำ

สินค้าสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากเป็นสินค้าที่มีการส่งออกและนำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นลำดับต้นๆ เช่น กุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง หมึกสดแช่เย็นแช่แข็ง ปลาสดแช่เย็นแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปอื่นๆ ตลาดส่งออกสัตว์น้ำที่และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่สำคัญของไทยได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป และประเทศแถบอาเซียน

การส่งออกสินค้าสัตว์น้ำไปยังต่างประเทศนั้น ผู้นำเข้าส่วนใหญ่กำหนดว่าสินค้าสัตว์น้ำที่นำเข้าจะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของสินค้าก่อนการส่งออก โดยมีการรับรองคุณภาพจากหน่วยงานราชการจากประเทศผู้ส่งออกประกอบการนำเข้าและต้องตรวจสอบคุณภาพตามข้อกำหนดและมาตรฐานของประเทศผู้นำเข้านั้นๆ เพื่อให้มั่นใจว่าสินค้าดังกล่าวมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งนี้ประเทศผู้นำเข้ามีข้อกำหนดและมาตรฐานทางจุลชีววิทยาที่แตกต่างกัน รวมถึงการปรับปรุงมาตรฐานอยู่เสมอขึ้นอยู่กับข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพสินค้าและข้อมูลการเกิดโรคระบาด

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสินค้าประมงตั้งแต่วัตถุดิบสัตว์น้ำจนถึงผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวทำให้ก่อโรคที่สำคัญและพบการปนเปื้อนสูงได้แก่กลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* สัตว์น้ำที่จับมาเป็นวัตถุดิบทั้งจากธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงจะมี จุลินทรีย์ปนเปื้อนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและคุณภาพของน้ำที่สัตว์อาศัยอยู่ ซึ่งแหล่งน้ำอาจได้รับการปนเปื้อนมาจากแหล่งชุมชน น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำทิ้งจากการเพาะเลี้ยง เป็นต้น การปนเปื้อนเหล่านี้มักหาวิธีป้องกันได้ยาก เช่นการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp., *Escherichia coli, Vibrio pavahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae* ฯลฯ ถ้าเป็นการปนเปื้อนที่เป็นปัญหาสุขลักษณะในกระบวนการผลิต เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* เป็นต้น มีแหล่งเชื้อมาจากคน วัตถุดิบ และเครื่องมือเครื่องใช้ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ

ความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ของสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับสัตว์น้ำ และอาหาร โรคที่เกิดจากอาหาร (Food borne disease) มีมากกว่า 250 ชนิด การติดเชื้อที่เกิดขึ้นในอาหาร (food borne infections) เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในกระบวนการแปรรูป สัตว์น้ำ บางชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำถึงจุดเยือกแข็ง (Miget, 1991) ดังนั้นในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง

แช่เยือกแข็งจึงต้องตรวจสอบแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำ ในอาหาร และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง ที่สำคัญได้แก่ *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae*

Salmonella spp. จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเซลล์รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง (35-37°C) แต่พบรายงานว่าสามารถเจริญได้ระหว่าง 5-47°C (Adams and Moss, 1995; มัทนา, 2548 และ สุมณฑา, 2549) คนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยปฐมภูมิตามธรรมชาติ (primary habitat) ของเชื้อนี้ แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของเชื้อ *Salmonella* spp. คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่นสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง แต่บางครั้งอาจพบเชื้ออยู่ตามร่างกายของมนุษย์ และสัตว์ก็เป็นได้ จากลำไส้แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำ แพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วงเวียนเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหาร สู่ลำไส้มนุษย์และสัตว์วนเวียนเป็นวัฏจักร การไม่เลือกโฮสต์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษได้ภายในเวลา 12-14 ชั่วโมง หลังบริโภคอาหาร ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่น และท้องเดิน ตามด้วยอาการเหงื่อแตก อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ เป็นลม มีไข้ปานกลาง มึนงง อาการมักทรงอยู่ราว 2-3 วัน อัตราการตายเฉลี่ยร้อยละ 4.1 (สุมณฑา, 2549)

Vibrio cholerae เป็นแบคทีเรียที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำทะเล และปนเปื้อนมากับอาหารทะเล เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น โค้งงอเล็กน้อย เคลื่อนโดยอาศัยแส้ที่ขั้วเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ให้เอนไซม์คะทะเลสและออกซิเดส ต้องการแกลือแร่ในการเจริญ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง พบอาศัยอยู่ในน้ำสกปรก และปนเปื้อนในอาหาร ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งเป็นโรคติดต่อ ทั้งสายพันธุ์ที่ตกตะกอนและไม่ตกตะกอนกับแอนติซีรั่มกลุ่ม O1 สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ กลุ่มที่ไม่ตกตะกอนเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในดินแถบปากอ่าวที่มีอินทรีย์วัตถุทับถม และเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์ทะเล ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำลายเนื้อเยื่ออ่อน และอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตแต่ความรุนแรงไม่เท่ากับ *V. cholerae* O1 (สุมณฑา, 2549)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคและชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

บทที่2

การตรวจเอกสาร

ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นสินค้าที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญมีผลต่อเศรษฐกิจระดับประเทศเป็นอย่างมากเนื่องจากสินค้าทะเลหลายชนิดสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้ปีละหลายล้านบาท ส่วนการนำเข้าสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าในประเทศ แล้วทำการแปรรูปก่อนส่งออกไปยังต่างประเทศ สินค้าสัตว์น้ำที่นำมาแปรรูปในประเทศไทย มีแหล่งที่มาจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ปูทะเล ปูม้า ปลาทะเล กุ้งทะเล หมึก หอยลาย หอยตลับ ส่วนสัตว์น้ำที่มาจากการเพาะเลี้ยงได้แก่ หอยแครง หอยแมลงภู่ หอยนางรม กุ้งกุลาดำ กุ้งขาววานาไมด์ ปูนิ่ม ในปัจจุบันสินค้าที่มาจากการเพาะเลี้ยงถึงแม้ว่าปริมาณจะน้อยกว่าที่มาจากการจับจากธรรมชาติ แต่คิดเป็นมูลค่าสูงกว่าสินค้าที่มาจากธรรมชาติ (กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง, 2544)

ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง หมายถึง ผลผลิต ที่ได้จากการเอาสัตว์น้ำจากการทำการประมงมาแปรรูปโดยวิธีต่างๆ เพื่อจะได้เก็บสัตว์เหล่านั้นไว้บริโภคนานวันขึ้นซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการในการแปรรูปสัตว์น้ำ เช่น ผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งอาจเก็บได้หลายเดือนในขณะที่ผลิตภัณฑ์บรรจุกระป๋องสามารถเก็บได้เป็นปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่เอามาแปรรูป ถ้าเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพผลิภัณฑ์ที่ได้ก็จะมีคุณภาพไปด้วย (Doe and Olley,1990) อ้างโดย (มัทนา,2545) ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงอาจจำแนกเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้คือ

1. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่แปรรูปโดยเกิดจากกระบวนการหมัก (Fermented product) เป็นผลิตภัฑฑ์ที่ได้มาจากการหมักสัตว์น้ำกับเกลือในอัตราส่วนที่พอเหมาะปริมาณเกลือที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมักได้แก่ กะปิ น้ำปลา ปลาร้า ปลาจ๋อม ไตปลา เป็นต้น

2. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงตากแห้ง (Dried product) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกำจัดความชื้นออกจากสัตว์น้ำโดยการตากแห้ง (drying) หรือโดยการทำเค็ม (sait curing) แล้วนำมาตากแห้ง การตากแห้งอาจใช้แสงแดดธรรมชาติ (naturel drying) หรือใช้เครื่องมือช่วยให้ผลิตภัณฑ์แห้ง (mechanical drying) เช่น ใช้เตาอบ

3. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงประเภทดองเค็มแล้วเอามาตากแห้ง (Salted dried products) วิธีหนึ่งซึ่งนิยมในการทำปลาเค็มตากแห้ง (dry salting method) คือ เคนซ์ โพรเซส (Kench process) วิธีนี้นิยมทำกันมาอย่างกว้างขวาง มักใช้ปลาที่มีไขมันต่ำ เช่น ปลาคอด (Wheton and Lawson, 1985)อ้างโดย (มัทนา,2545)

4. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงประเภทแช่เยือกแข็ง (Frozen product) ได้แก่ กุ้ง ปลา ปลาหมึกแช่แข็ง และสัตว์น้ำอื่นๆรวมทั้งผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคที่แช่แข็งไว้ เมื่อจะบริโภคก็นำมานึ่งหรือทอด เช่น ขนมจีบ ฮะเก๋า ปลาชุบแป้ง กุ้งชุบแป้ง

5. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงประเภทแช่บรรจุกระป๋อง (Canned products) ได้แก่ กุ้งในน้ำเกลือ ปลาซาร์ดีนในซอสมะเขือเทศ ปลาทูน่าในน้ำมัน

6. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงประเภทรมควัน (Smoked products) สัตว์น้ำที่นำมารมควันได้แก่ปลาเนื้ออ่อน ปลาหมอ ปลาสลาด ปลากระเบน

7. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงประเภทเบ็ดเตล็ด (Other fish products) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่จัดอยู่ใน 6 ประเภทดังกล่าวข้างต้น ตัวอย่างเช่นน้ำพริกปลาย่าง น้ำพริกกุ้งเสียบ ไส้กรอกปลา (fish sausages) ฟิชเบอร์เกอร์ (fish burger) เป็นต้น (มัทนา,2545)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปท่อน ต้องการออกซิเจนในการเติบโต มีความสามารถในการทนความร้อน สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คน และสัตว์อื่นๆ เช่น หมู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว และม้า เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในคนนั้น ส่วนมากจะได้รับเชื้อปะปนมากับน้ำและอาหาร และบางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามอาคารบ้านเรือน ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ หรือหากมีผู้ป่วยเป็นโรค Salmonellosis ทำงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหารแล้วมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีพอ เช่น ไว้เล็บยาว และหลังจากกลับจากห้องน้ำมิได้มีการล้างมือให้สะอาดเสียก่อนเชื้อ *Salmonella* spp.ก็มีโอกาสที่จะปนเปื้อนลงไปยังอาหารได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงประกอบกับเชื้อมีอัตราการแพร่ระบาดสูง จึงสามารถพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ในอัตราสูงด้วย *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษที่เรียกว่า *Salmonellosis* อาการจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง และจะมีอาการอยู่ในระหว่าง 1-5 วัน เมื่อร่างกายเราได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. เข้าสู่ร่างกายแล้ว เชื้อโรคจะมุ่งเข้าสู่เซลล์น้ำเหลืองของลำไส้เล็ก และจะเจริญแบ่งตัวที่นั่น ในระยะนี้จะยังไม่มีอาการอะไรเป็นระยะฟักตัว ต่อมาเชื้อจะแพร่เข้าสู่กระแสเลือดและกระจายสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย ผู้ป่วยจะเริ่มแสดงอาการในรายที่ไม่มีโรคอื่นแทรกซ้อน จะมีชีพจรเต้นช้ากว่าปกติ ผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้มักจะเสียชีวิตเนื่องจากเลือดออกในลำไส้เล็ก และลำไส้ทะลุ สำหรับอาการทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดศีรษะ ปวดท้อง มีไข้ หนาวสั่น และอ่อนเพลีย โดยความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นนั้นจะแตกต่างไปตามปริมาณเชื้อที่บริโภค ชนิดของเชื้อที่บริโภค และความต้านทานของผู้บริโภค ทั้งนี้เชื้อ *Salmonella* spp.มีหลายชนิดแต่ละชนิดมีลักษณะทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกันไป จึงทำให้การติดเชื้อ และอาการของ

โรคแตกต่างกันตามไปด้วย สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. ที่สำคัญได้แก่ โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) โรคโลหิตเป็นพิษ (Septicemia) และไข้ไทฟอยด์ (Typhoid Fever) การควบคุม *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสัตว์สู่คนผ่านทางอาหาร คือ เน้นที่การปรุงอาหารให้สุกเพื่อทำลายซัลโมเนลลาที่อาจจะปนเปื้อนมาในอาหาร ส่วน enteric fever ซึ่งเป็นโรคเฉพาะในคน ดังนั้น การเข้มงวดเรื่องการสุขาภิบาลและความสะอาดจะช่วยควบคุมโรคได้ (ศุภชัย, 2549)

ในผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อซัลโมเนลา แพร่กระจายในอาหารหลายชนิดที่มี เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนประกอบ สัตว์ปีกเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ เนื้อไก่กระทงชำแหละมีการปนเปื้อนเชื้อ ซัลโมเนลาอยู่ระหว่างร้อยละ 20-70 (อรุณ บ่างตระกูลนนท์และคณะ, 2536: Rusal et al., 1996) อ้างโดย (สุมณฑา, 2545) ระหว่างปี ค.ศ.1963-1965 สติลแลกัลตัน ได้ศึกษาการระบาดของเชื้อซัลโมเนลลาที่เกิดกับมนุษย์ 61 ครั้ง สรุปได้ดังนี้ (Steele and Galton, 1967) อ้างโดย (สุมณฑา, 2545)

1. ร้อยละ 23 มีสาเหตุมาจาก ไข่ไก่และผลิตภัณฑ์จากไข่
2. ร้อยละ 16 มีสาเหตุมาจาก ไก่และไก่งวง
3. ร้อยละ 8 มีสาเหตุมาจาก เนื้อโคและเนื้อสุกร
4. ร้อยละ 3 มีสาเหตุมาจาก ไอศกรีม
5. ร้อยละ 2 มีสาเหตุมาจาก สลัดมันฝรั่ง
6. ร้อยละ 9 มีสาเหตุมาจาก อาหารอื่นๆ

Vibrio spp. ที่สำคัญอันเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษที่มักเกี่ยวข้องกับอาหารทะเล มีอยู่ 3 spp. ด้วยกัน คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* โดย *Vibrio cholerae* มักจะเกี่ยวข้องกับปลาและหอยที่จับได้จากเขตทะเลที่มีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลจากชุมชนที่มีการระบาดของเชื้อนี้อยู่ เนื่องจาก *Vibrio cholerae* เป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนเท่านั้น ดังนั้น แหล่งที่มาของเชื้อที่สำคัญจึงเกี่ยวข้องกับเขตชุมชนหรือสุขอนามัยส่วนบุคคลของผู้ป่วย ทำให้มีการแพร่กระจายไปสู่ *Vibrio cholerae* ค่อนข้างจะรุนแรง (อหิวาตกโรค) บางครั้งอาจจะถึงแก่ชีวิตได้ เนื่องจากการเสียน้ำจากร่างกายเป็นจำนวนมาก ในกรณีของ *Vibrio parahemolyticus* เกี่ยวข้องกับการบริโภคปลาและหอยแบบดิบหรือกึ่งดิบกึ่งสุก ส่วนการระบาด *Vibrio vulnificus* จะเกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยแบบดิบ (ศุภชัย, 2549)

Vibrio cholerae ชนิดที่มีรายงานการระบาด เช่น serogroup 01 classical Biotype และ EI Tor Biotype (11, 13) พบได้ในน้ำทะเลชายฝั่ง (coastal water) serotype ส่วนใหญ่ก่อโรคได้

(virulent) โดยบาง serotype อาจจะก่อโรครุนแรงกว่า ยังไม่ชัดเจนว่าทำไมการที่พบจุลินทรีย์นี้อยู่ได้บ่อยแต่กลับพบการระบาด (epidemic) น้อยครั้งมาก อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาด เช่น ปลาดิบ หอยดิบ ปูกุ้ง ผักดิบ น้ำ อาหารที่ล้างด้วยน้ำที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ โรคที่เกิดจาก *Vibrio cholerae* คือ อหิวาตกโรค (cholera) เป็นรูปแบบอาการที่รุนแรงที่สุดของ gastroenteritis แบคทีเรียผ่านเข้าไปเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในลำไส้ตามด้วยการสร้าง enterotoxin ซึ่งจะผ่านเข้าไปในเซลล์ลำไส้ (enterocyte) enterotoxin จะไปรบกวนลำดับขั้นตอนปฏิกิริยาการควบคุมสมดุลประจุ (ion) และน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ลำไส้ที่ได้รับ enterotoxin เข้าไปจะมีการสร้าง cyclic AMP มากเกินไป โดยที่ cyclic AMP ทำหน้าที่กระตุ้นการรับ (release) เกลือแร่ (electrolyte) ออกจากเซลล์ตามหลักความดันออสโมติค (osmotic pressure) แล้ว เมื่อมีการเสียเกลือแร่ออกจากเซลล์ก็จะมีการขับน้ำตามออกมาจากเซลล์ด้วย ทำให้มีอาการถ่ายเหลว (diarrhoea) เชื้อตัวที่รุนแรงมากๆ อาจจะทำให้เสียน้ำได้มากถึง 1 ลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งผู้ป่วยจะเสียชีวิตได้ถ้าไม่ได้รับน้ำเกลือทางเส้นเกลือ (intravenous rehydration) (ศุภชัย, 2549)

ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค ประมาณหลายร้อยเซลล์ มีระยะฟักตัวโรค 1-5 วัน แต่ที่พบบ่อย คือ ประมาณ 23 วัน อาการ explosive, potentially fatal dehydrating diarrhoea มีระยะเวลาป่วยนานหลายวัน และอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 60 ถ้าไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที การแพร่กระจายและการควบคุม การระบาดอาจจะเกิดจากน้ำทะเลชายฝั่ง อาหารทะเล เช่น หอย (shellfish) ที่ไม่สุก การดื่มน้ำทะเลชายฝั่งเข้าไปโดยไม่ได้ตั้งใจทำให้เกิดการป่วยเป็นรายๆ ทั่วโลก อย่างไรก็ตาม โรคมักจะไม่ระบาดจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง (person-to-person) แต่ถ้าผู้ป่วยเป็นรายๆ เหล่านี้บังเอิญปนเปื้อน จุลินทรีย์ลงในแหล่งน้ำ (water supply) ของชุมชนแล้วจะทำให้เกิดโรคระบาดได้ การแพร่กระจายระหว่างชุมชนผ่านทางแหล่งน้ำ การควบคุม คือ การสุขาภิบาล การทำน้ำดื่มให้บริสุทธิ์ การปรุงอาหารทะเล (หอย) ให้สุกอย่างทั่วถึงและเพียงพอ (มัทนา, 2538)

บทที่3
เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการดำเนินการ

ระยะเวลา 6 เดือน เริ่มจากวันที่ พฤศจิกายน 2551 ถึงวันที่ พฤษภาคม 2552

<u>ตารางที่ 1</u> แผนดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนการศึกษา	ระยะเวลา						
	พ.ย. 51	ธ.ค. 51	ม.ค. 52	ก.พ.52	มี.ค. 52	เม.ย.52	พ.ค. 52
ส่งชื่อเรื่อง		↔					
ศึกษาข้อมูล	↔	↔	↔	↔			
ทำแบบฟอร์มปัญหาพิเศษ			↔	↔			
ทำการศึกษา	↔	↔	↔	↔	↔		
สรุปผลการศึกษา					↔	↔	
เขียนรายงาน						↔	↔

สถานที่รวบรวมข้อมูล

ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี 20/62 หมู่ที่ 7 ตำบล ท่าข้าม อำเภอ พุนพิน จังหวัด สุราษฎร์ธานี

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงจากแหล่งในเขต 7 จังหวัดภาคใต้ตอนบน ได้แก่ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ชุมพร ระนอง พังงา ภูเก็ต และกระบี่ โดยแยกกลุ่มของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงตามชนิดของสัตว์น้ำที่เป็นวัตถุดิบได้ 5 กลุ่ม คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา

1.2 ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างนาน 3 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2548 ถึงเดือน กันยายน 2551

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.1 อุปกรณ์

2.1.1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2.1.2 ตู้อบฆ่าเชื้อ

2.1.3. ตู้บ่มเชื้อ

2.1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่งยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 3100S

2.1.5 เครื่องตีตัวอย่าง (Stomacher Lab Blender) ยี่ห้อ Seward รุ่น 400 (BA 7021)

2.1.6 จานเลี้ยงเชื้อ

2.1.7 แผ่นกระจกสไลด์

2.1.8 ปิเปต

2.1.9 ตะเกียงแก๊ส

2.1.10 แอลกอฮอล์ (70% v/v)

2.1.11 loop เขี่ยเชื้อ

2.1.12 เข็มเขี่ยเชื้อ

2.1.13 ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หรือ Platinum loop สำหรับทดสอบ Oxidase Test

2.1.14 กระดาษกรอง เบอร์ 1

2.1.15 Water bath

2.1.16 นาฬิกาจับเวลา

2.1.17 กระดาษวัด pH

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ

2.2.1 Lactose broth (LB) M74

2.2.2 Tetrathionate broth M145 ผสม brilliant green และ iodine (TT) บรรจุในหลอด ๆ ละ 10 ml

2.2.3 Rappaport – Vassiliadis broth (RV) M132 บรรจุในหลอด ๆ ละ 10 ml

2.2.4 Bismuth Sulfite Agar (BS) M19 เตรียมก่อนใช้ 1 วันและเก็บในที่มืด

2.2.5 Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) M179

2.2.6 Hektoen enteric agar (HE) M61

2.2.7 Mac Conkey agar (Mac) M91

2.2.8 Triple Sugar iron agar (TSI) M149

2.2.9 Lysine iron agar (LIA) M89

2.2.10 Urea broth (UB) M171

2.2.11 KCN broth M126

2.2.12 Tryptone (tryptophane) broth M164

2.2.13 Phenol red carbohydrate (dulcitol, lactose, sucrose) broth (PRCB) M121

2.2.14 Lysine decarboxylose broth M87

2.2.15 MR-VP broth M104

2.2.16 Methyl red indicator R44

2.2.17 40% KOH (Potassium hydroxide solution, 40%) R65

2.2.18 α - Napthol

2.2.19 Iodine solution (สำหรับ Tetrathionate broth)

2.2.20 1% Brilliant green dye solution R8 (สำหรับ Tetrathionate broth)

2.2.21 0.85 % NaCl solution

2.2.22 *Salmonella* OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF, และ OMG antiserum

2.2.23 *Salmonella* O Polyvalent A-I antiserum

2.2.24 API 20E

2.2.25 Simmon citrate agar

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารทดสอบ *Vibrio cholerae*

2.3.1 Alkaline Peptone Water (APW) M10

2.3.2 Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar (TCBS) M147

2.3.3 Tryptic (trypticase) Soy Agar + 2% NaCl (TSA 2 %NaCl) M152

2.3.4 Tryptone broth 1 % (T_1 N_0) M164

2.3.5 Tryptone broth 1 % NaCl 3 %(T_1 N_3) M161

2.3.6 1% N,N,N,N-Tetramethyl-p-Phenylenediamine dihidrochoride (oxidase test reagent) R54

2.3.7 Arginine glucose slant (AGS) M16

2.3.8 *Vibrio cholerae* O1 Polyvalent Antiserum

2.3.9 *Vibrio cholerae* O139 Antiserum

2.3.10 *Vibrio cholerae* Inaba Antiserum

2.3.11 *Vibrio cholerae* Ogawa Antiserum

2.3.12 0.85 % NaCl Solution R63

2.3.13 0.5% Sodium desoxycholate R91

2.4 การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp.

2.4.1. Pre-enrichment ชั่งตัวอย่าง 125 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติม Lactose Broth 1,125 ml ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 2 นาที มัดปากถุงหลวม ๆ แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 ± 5 นาที เขย่าถุงเบาๆ ให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน แล้ววัดค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 หากค่า pH ไม่อยู่ในช่วงที่กำหนดให้ปรับด้วย กรดหรือด่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. (กรณีตัวอย่างที่อยู่ในสภาพแช่แข็ง ไม่ควรปล่อยทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ถ้าจำเป็นให้ละลายได้ที่ 45 ± 0.2°C แต่ต้องไม่เกิน 15 นาที หรือให้ละลายที่ 2-5 °C เป็นเวลา 18 ชม.

2.4.2. Selective Enrichment นำถุงตัวอย่างที่บ่มครบตามเวลาที่กำหนดเขย่าถุงเบาๆ ก่อนปิเปตตัวอย่างมา 1 ml ถ่ายเชื้อลงใน TT 10 ml นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 43 ± 0.2°C สำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อสูง เช่น ของสด อาหารพร้อมปรุง อาหารรับประทานดิบ และที่อุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม. สำหรับตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนทางเชื้อน้อย เช่น ของแห้ง อาหารพร้อมบริโภค และดูดมา 0.1 ml ถ่ายเชื้อลงใน RV 10 ml นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 42 ± 0.2°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.

2.4.3. Selective plating

2.4.3.1 เมื่อบ่มครบตามกำหนดแล้ว ให้เขย่าเชื้อก่อนจะ streak เชื้อจากหลอด TT และ RV ลงบนเพลทของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ HE, BS และ XLD (BS ต้องเตรียมก่อนการ streak 1 วัน โดยเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะ streak) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2°C พลิกให้เพลทด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน บ่มนาน 24 ± 2 ชม. ในกรณีที่ไม่มีเชื้อขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BS ให้บ่มต่อไปจนครบ 48 ชม.

2.4.3.2 ลักษณะ Typical colony ของ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

HE : โคโลนีกลม สีเขียวน้ำเงิน จนถึงสีน้ำเงิน อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีสีเขียว แต่อาจพบโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีจุดดำแวววาวตรงกลาง หรืออาจดำทั้งโคโลนี

XLD : โคโลนีกลม สีชมพูใส อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู แต่อาจพบโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีจุดดำแวววาวตรงกลางหรืออาจดำทั้งโคโลนี

BS : โคโลนีกลม สีน้ำตาล , เทาหรือดำ อาจมี metallic sheen หรือไม่มีก็ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ รอบ ๆโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในช่วงแรกและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อบ่มนานขึ้น และอาจจะมีลักษณะบุ๋มตรงกลางที่เรียกว่า halo effect

2.4.3.3 เมื่อบ่มครบ 24 ชม. หากมีเชื้อที่ให้ลักษณะ typical colony บน HE หรือ XLD ให้ทำการเลือกมา 2 โคโลนีหรือมากกว่า กรณีที่ไม่มี typical ให้เลือก atypical colony มา 2 โคโลนีหรือมากกว่า จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบทาง biochem ต่อไป ส่วน BS เมื่อบ่มครบ 24 ชม. ถ้ายังไม่ได้ลักษณะของ typical colony ให้บ่มเชื้อต่อไปอีก 24 ชั่วโมงก่อนเลือก typical colony โดยเลือกมาจำนวน 2 โคโลนีหรือมากกว่า กรณีที่ไม่มี typical ให้เลือก atypical colony มา 2 โคโลนี หรือมากกว่า นำมาทดสอบทาง biochem ต่อไป

2.4.3.4 ลักษณะ atypical colony ของ *Salmonella* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีดังนี้

HE และ XLD : โคโลนีกลม สีเหลือง อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลางโคโลนี

BS : โคโลนีกลม สีเขียว อาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือไม่เปลี่ยนก็ได้

2.4.4 Biochemical Screening นำเชื้อที่ให้ลักษณะ typical colony หรือลักษณะ atypical colony ตามต้องการมาทดสอบคุณสมบัติทาง biochem โดยเขี่ยเชื้อจากจุดตรงกลางโคโลนีเดียวกันและจะต้องเขี่ยเชื้อเพียงครั้งเดียวแล้วถ่ายลงอาหารทดสอบให้ครบชุด

2.4.4.1 การทดสอบการใช้น้ำตาลใน TSI ใช้ needle ถ่ายเชื้อลงใน TSI โดย streak บน slant และแทงลงในส่วนของ butt ในลักษณะแนวดิ่งตรง ปิดฝาหลวมๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชม.เชื้อ typical colony ของ *Salmonella* spp. สามารถใช้ glucose ได้เพียงอย่างเดียวจึงให้ผลใน TSI เป็น K/A มีแก๊ส และอาจจะสร้างหรือไม่สร้าง H_2S

2.4.4.2 การทดสอบในอาหาร LIA ใช้ needle ที่ถ่ายเชื้อลงใน TSI แล้วมาถ่ายเชื้อต่อลงใน LIA โดย แทงลงในส่วนของ butt ในลักษณะแนวดิ่งตรง 2 ครั้ง ความลึกประมาณ 4 cm จากนั้นนำมา streak บน slant และ ปิดฝาหลวมๆ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2°C เป็นเวลา

24 ± 2 ชม. อ่านผล เชื้อ typical colony ของ *Salmonella* spp. สามารถสร้างเอ็นไซน์ lysine decarboxylase ได้ จึงให้ผลใน LIA เป็น K/K แต่อาจมีหรือไม่มีแก๊ส และสร้าง H_2S ในกรณีที่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แสดงสีอะไรเลยอย่าทิ้ง ให้ทำการทดสอบต่อไป

หลักการพิจารณาผลจาก TSI และ LIA

- ถ้า LIA ให้ผลเป็น K/K purple ให้นำไปทดสอบต่อได้เลย (โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลของ TSI)
- ถ้าใน LIA ให้ผลเป็น K/A แต่ใน TSI ให้ผลเป็น K/A ก็ให้นำไปทดสอบต่อได้เลย
- ถ้าใน LIA ให้ผลเป็น K/A แต่ใน TSI ให้ผลเป็น A/A แสดงว่าไม่ใช่เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ทิ้งได้

2.4.5. การแยกเชื้อ *Salmonella*

2.4.5.1 การแยกเชื้อโดยใช้ Mac Conkey agar ใช้ needle เขี่ยเชื้อที่ทดสอบคุณสมบัติทาง biochem จาก TSI ว่ามีลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp มาทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mac Conkey agar 1 เส้น จากนั้นใช้ loop streak เชื้อบนผิวหน้าอาหารที่ใช้ needle ขีดไว้ แล้วนำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C นาน 24± 2 ชม อ่านผล ลักษณะโคโลนี Mac Conkey agar จะมีลักษณะของโคโลนีใสไม่มีสี สามารถมองทะลุผ่านได้ แต่บางครั้งอาจมีจุดสีดำตรงกลาง ถ้าพบว่ามีโคโลนีลักษณะอื่นด้วยให้เลือกโคโลนีลักษณะกลมใสไม่มีสีมาทดสอบใหม่ตั้งแต่ขั้นตอนการ streak ลงบน HE, BS, XLD และการทดสอบเชื้อลงใน TSI และ LIA

2.4.5.2 การแยกเชื้อโดยใช้ Urease test ใช้ needle เขี่ยเชื้อบน TSI slant ซึ่งได้ผลการสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. ลงใน urea broth จากนั้นบ่มที่ 35± 2°C เป็นเวลา 24± 2 ชม ในขั้นตอนนี้ให้ทำ negative และ positive control ควบคู่ไปด้วย เชื้อ *Salmonella* spp. จะให้ผลลบด้วยวิธีนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนสี ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงให้ทิ้งได้เลย ในกรณีที่เชื้อให้ผลเป็นลบด้วยวิธี urease test ให้นำเชื้อมาทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

- Lysine decarboxylase broth (ถ้าการทดสอบบน LIA slant เป็นที่น่าพอใจ ก็ไม่จำเป็นต้องทำวิธีนี้) เขี่ยเชื้อจาก TSI ลงใน Lysine decarboxylase broth ปิดฝาให้แน่น จากนั้นบ่มเชื้อที่ 35 ± 2°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง โดยตรวจทุก 24 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* spp. จะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อใสไม่มีสี ให้หยด 0.2% bromcresol purple ลงไป 2-3 หยด ก่อนอ่านผล
- Phenol red dulcitol broth เขี่ยเชื้อจาก TSI ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหลอดดักแก๊สอยู่ด้านใน จากนั้น ปิดฝาแบบหลวม ๆ นำไปบ่มเชื้อที่ 35 ± 2°C เป็นเวลา 48 ± 2 ชม. โดยตรวจดู

ทุก 24 ชม. เชื้อ *Salmonella* spp. จะให้ผลบวกคือเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลืองและมีแก๊ส ยกเว้น *S. arizonae* จะให้ผลลบ คืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี และไม่มีแก๊ส

- Tryptone broth เขี่ยเชื้อจาก TSI ลง Tryptone broth จากนั้นบ่มที่ 24 ± 2 ชั่วโมง ที่ 35 ±2 °C จากนั้นทำตามขั้นตอนดังนี้ ถ่ายเชื้อจาก tryptone broth มา 1 loop ใส่ลงใน KCN broth ปิดฝาให้สนิทพันด้วย Parafilm จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชม. แต่เริ่มอ่านผลได้หลังจากบ่มครบ 18 ชม. *Salmonella* เกือบทุก species ให้ผลลบด้วยวิธีนี้

2.4.6. การทดสอบคุณสมบัติทาง Biochem ด้วย API 20E diagnostic strips and reagents หลังจากทดสอบทาง Biochem และผลการทดสอบตรงตามลักษณะข้างต้นแล้ว ให้นำเชื้อดังกล่าวจากหลอด TSI ที่มีอายุประมาณ 24 ชม. มาทดสอบคุณสมบัติทาง Biochem อื่น (เช่น Indole test, Malonate broth เป็นต้น) ด้วย API 20E diagnostic strips and reagents (Bio Merieux Vitek, Inc.) โดยดำเนินการตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตเป็นผู้กำหนด

2.4.7. Serological somatic (O) test ต้องมีการทดสอบ antisera กับ positive control ก่อนว่า antisera ยังสามารถใช้งานได้ ก่อนนำมาทดสอบกับตัวอย่าง หลักการคือ ทำการเขี่ยเชื้อจากหลอด TSI ที่ให้ผลทาง biochem ด้านบน ทั้งหมดตรงตามลักษณะของเชื้อ *Salmonella* spp. มาทดสอบการตกตะกอนกับ *Salmonella* Polyvalent O antiserum A-I และ *Salmonella* OMA, OMB, OMC, OMD, OME, OMF, OMG antiserum และใช้น้ำเกลือ 0.85% เป็นตัวเปรียบเทียบ โดย *Salmonella* spp. จะต้องตกตะกอนเมื่อทดสอบกับ antiserum กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง และน้ำเกลือ 0.85 % จะต้องไม่ตกตะกอน

2.4.8. ในกรณีที่โคโลนีบน HE, BS หรือ XLD ให้ผลเป็น atypical colony ให้ทำการทดสอบเพิ่มดังนี้ ก่อนการทดสอบด้วย API 20E และตกตะกอนด้วย antiserum ตามลำดับ

2.4.8.1 Phenol red lactose broth เขี่ยเชื้ออายุ 24-48 ชม. จาก TSI slant ของตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp.ลงใน phenol red lactose broth ที่มีหลอดดักแก๊สอยู่ นำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชม. ให้เริ่มทำการตรวจเมื่อครบเวลา 24 ชม.

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีแก๊สเกิดขึ้น

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี ไม่เกิดแก๊ส

Salmonella spp.ให้ผลลบด้วยวิธีนี้ ถ้าการทดสอบเป็นบวกให้ทิ้งตัวอย่างนั้นได้เลย ยกเว้นว่าถึงแม้จะให้ผลบวกด้วยวิธีนี้ ถ้า TSI slant ให้ผลเป็น A/A และให้ผลบวกจากการทดสอบด้วย LIA หรือเมื่อให้ผลบวกจากการทดสอบใน malonate broth ให้ทดสอบด้วยวิธีอื่นต่อไป เพราะอาจจะเป็นเชื้อ *S.arizonae*

2.4.8.2 MR–VP เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชม. บน TSI slant ลงใน MR-VP จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 48 ± 2 ชม.

- VP : หลังจากบ่มครบเวลาตามที่กำหนด 48 ชม. ให้ทำการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง โดยดูด MR-VP ที่บ่มครบเวลา 48 ชม. มา 1 มล. ส่วนที่เหลือบ่มต่อที่ 35 ± 2 °C อีก 48 ชม. จากนั้นเติม 0.6 มล. ของ α-napthol เขย่าให้เข้ากัน เติม 0.2 มล. ของ 40% KOH ลงไป เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วเติม creatine ลงไปเล็กน้อย อ่านผลเมื่อเวลาครบ 4 ชม.

ผลบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู ถึงชมพูเข้ม

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี

เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ผลลบด้วยวิธีนี้

- MR : หลังจากที่บ่มครบเวลา 96 ชม. ให้ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง โดยดูด MR-VP มา 5 มล.จากนั้นเติม methyl red 5-6 หยด อ่านผลทันที

ผลบวก : มีการกระจายของสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลือง

เชื้อ *Salmonella* spp.ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้

ให้ทิ้งตัวอย่างที่ให้ผลบวกใน VP และให้ผลลบด้วย MR

2.4.8.3 Phenol red sucrose broth ทำเหมือนกับ Phenol red lactose broth เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ผลลบด้วยวิธีนี้ ถ้าให้ผลบวกให้ทิ้งได้เลย ยกเว้น TSI ให้ผล A/A และให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วย LIA

2.4.8.4 Simmon citrate agar เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 24-48 ชม. บน TSI slant ลงใน Simmon citrate agar โดย streak ลงบน slant และ stab ลงใน butt จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 96 ± 2 ชม. เชื้อ *Salmonella* spp. ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้คือ สีอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน

2.5 การวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio cholerae*

2.5.1. Pre-enrichment ชั่งตัวอย่าง 125 ± 0.1 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติม Alkaline Peptone Water (APW) 1,125 มล. ตีให้ตัวอย่างกระจายทั่วสารละลายด้วยเครื่องตีตัวอย่าง เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบสูงสุด มัดปากถุงหลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 6-8 ชม.สำหรับตัวอย่างที่ผ่านขบวนการผลิตต่างๆ เช่น ผ่านความร้อน ทำแห้ง และการแช่เยือกแข็ง ให้บ่มข้ามคืน (18 -24 ชม.) จากนั้นนำไป streak ลงบน TCBS

สำหรับวิเคราะห์หอยนางรมสด ให้ชั่งเนื้อหอยที่ตัดละเอียดมาแล้ว 25 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ แล้วเติม APW ปริมาตร 2,475 ml. ลงไป จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath ที่ 42 ± 0.2 ^{0}C เป็นเวลา 18 – 21 ชม.

2.5.2. การเขี่ยเชื้อลงเพลทเพื่อดูลักษณะโคโลนี ใช้ Loop แตะเชื้อบริเวณส่วนบนของตัวอย่างที่บ่มครบตามเวลาที่กำหนด โดยไม่ต้องเขย่าถุงมา streak ลงบนเพลท TCBS Agar กลับให้เพลทด้านที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ด้านบน นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 ^{o}C นาน 18 - 24 ชม. โดยโคโลนีของ *Vibrio cholerae* บน TCBS Agar จะมีสีเหลืองเนื่องจากสามารถใช้น้ำตาล sucrose ได้ ขนาดโคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ ค่อนข้างแบน ตรงกลางโคโลนีขุ่นแต่ใสรอบนอก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว จำนวน 3 โคโลนี หรือมากกว่ามา streak บนเพลทอาหาร TSA + 2% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชม. เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ และถ่ายเชื้อจากเพลทอาหาร TSA + 2% NaCl ลงเพลทอาหาร TSA + 2% NaCl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 ^{0}C เป็นเวลา 18 – 24 ชม. อีกครั้ง เพื่อใช้สำหรับทดสอบการตกตะกอนกับ antiserum

<u>หมายเหตุ</u> เชื้อ *Vibrio cholerae* จะไม่สร้างโคโลนีที่มีขนาดเล็กและสีเหลืองครีมบน TCBS agar

2.5.3. ขั้นตอนการ screen และการยืนยันเชื้อ

2.5.3.1 Arginine glucose slant (AGS) ใช้ needle เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบน TSA+2%NaCl จากข้อ 5.4.2 แล้ว streak ลงบน slant จากนั้นแทงลงในส่วน butt ให้ถึงก้นหลอด ปิดฝาหลวมๆ จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 18-24 ชม.เชื้อ *V.cholerae* จะให้ slant สีม่วง และ butt สีเหลืองเล็กน้อย (K/a) ไม่สร้างแก๊สและไม่สร้าง H_2S

2.5.3.2 การทดสอบการเจริญในน้ำเกลือ ใช้ needle เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบน TSA+2%NaCl จากข้อ 5.4.2 ลงใน T_1N_0 และ T_1N_3 ปิดฝาหลวมๆ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 18-24 ชม. เชื้อ *V.cholerae* สามารถเจริญได้ใน T_1N_0 และ T_1N_3

2.5.3.3 String test ใช้ needle เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบน TSA+2%NaCl จากข้อ 5.4.2 วางไว้บนสไลด์สะอาด จากนั้นหยด 0.5% sodium desoxycholate ลงไป 1 หยด ภายในเวลา 1 นาที เซลล์จะแตกทำให้ DNA ออกมานอกเซลล์ เมื่อใช้ loop คนเชื้อ แล้วยก loop ขึ้นจะมีลักษณะคล้ายยางเหนียวๆ มีความสูงได้ถึง 2-3 มิลลิเมตร

2.5.3.4 Oxidase reaction เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบน TSA +2%NaCl จากข้อ 5.4.2 โดยใช้ platinum loop หรือไม้จิ้มฟันป้ายลงบนกระดาษกรองที่ชุบสารละลาย 1 % N,N,N,N'-Tetramethyl-Phenylene-diamine dihydrochoride เชื้อ *V.cholerae* จะทำให้สีของกระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มภายใน10 วินาที

2.5.3.5 การทดสอบการตกตะกอน กับ antiserum หลังจากที่ทราบแล้วว่าตัวอย่างที่ทดสอบนั้นมีเชื้อ *V. cholerae* อยู่ และต้องการทราบว่าเป็น Subspecies ใด ให้ทำการทดสอบดังนี้ ทำเครื่องหมายไว้บนสไลด์ด้านล่าง จากนั้นหยดน้ำเกลือ 0.85% ลงไป 1 หยด เขี่ยเชื้อจาก TSA+2%NaCl จากข้อ 5.4.2 ลงบนสไลด์ คนให้เข้ากัน สังเกตการตกตะกอน ซึ่งจะต้องไม่พบว่ามีการตกตะกอนของเชื้อในน้ำเกลือ

- ทดสอบเชื้อ *V.cholerae* ว่าเป็น O1 หรือ O139 ทำเครื่องหมายไว้บนสไลด์ด้านล่าง จากนั้นหยด polyvalent *V. cholerae* O1 Antiserum ลงไป 1 หยด เขี่ยเชื้อจาก TSA+2%NaCl จากข้อ 5.4.2 ลงบนสไลด์ คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที สังเกตการตกตะกอน ทำการทดสอบเชื้อกับ polyvalent *V.cholerae* O139 โดยทำเช่นเดียวกับ polyvalent *V.cholerae* O1 ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกโดยตกตะกอนกับ Antiserum O139 ให้รายงานว่าพบ *V.cholerae* O139 ถ้าตกตะกอนกับ Antiserum O1 ให้รายงานว่าพบ *V.cholerae* O1ซึ่งถ้าผลการทดสอบเป็นบวกกับ O1 ให้ทำการทดสอบต่อไปว่า เป็น *V.cholerae* สายพันธุ์ใดระหว่าง Inaba และ Ogawa โดยทดสอบการตกตะกอนเช่นเดียวกับการทดสอบหา *V.cholerae* O1 และ *V.cholerae* O139 ถ้าตกตะกอนทั้ง Inaba และ Ogawa จะเป็น Serotype Hikojima

2.5.4. การรายงานผลการทดสอบว่าพบหรือไม่พบ *Vibrio cholerae*ในตัวอย่างอาหาร 125 กรัม

3. การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel Version 2002
2. วิเคราะห์ความเป็นอิสระของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* กับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ศึกษา โดยใช้สถิติทดสอบไคสแคว์ (Chi-square) (กัลยา, 2546)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

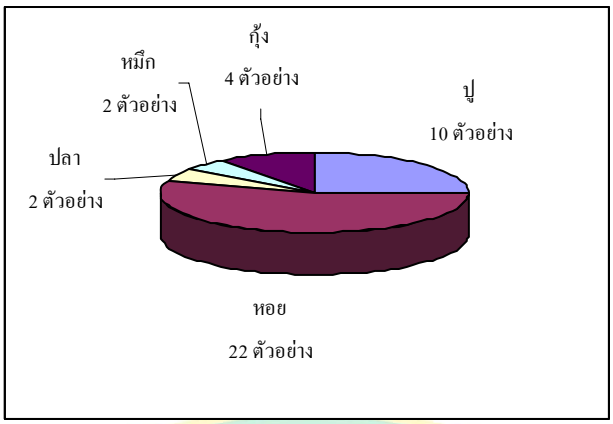
จากการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2549-2551 พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ และมีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบในปริมาณสูงได้แก่กลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* รายละเอียดดังนี้

1. จุลินทรีย์กลุ่ม *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา

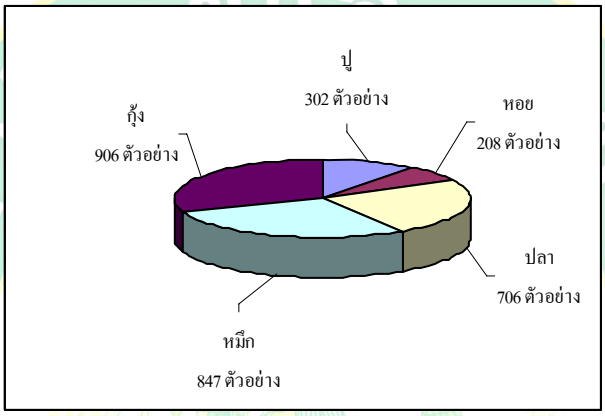
การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงจากแหล่งในเขต 7 จังหวัดภาคใต้ตอนบน จำนวน 3,063 ตัวอย่างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ5ชนิด คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม*Salmonella* spp.พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่พบเชื้อ*Salmonella* spp. มีทั้งหมด 40 ตัวอย่างโดยแยกตามชนิดสัตว์น้ำต่อไปนี้คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลาพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 4, 2, 10, 22 และ2 ตัวอย่างตามลำดับดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1 เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 9.57, 3.21, 0.44, 0.27 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 3

<u>ตารางที่ 2</u> ปริมาณตัวอย่างการตรวจพบและไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

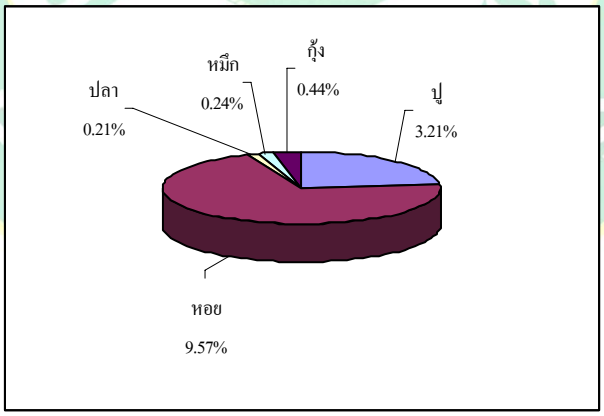
การตรวจเชื้อ	**ชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง**					
***Salmonella* spp.**	**กุ้ง**	**หมึก**	**ปู**	**หอย**	**ปลา**	**รวม**
ตรวจพบ	4	2	10	22	2	40
ตรวจไม่พบ	906	847	302	208	760	3,023
รวม (ตัวอย่าง)	**910**	**849**	**312**	**230**	**762**	**3,063**



<u>รูปที่ 1</u> แสดงชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ssp.



<u>รูปที่ 2</u> แสดงชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ssp.



<u>รูปที่ 3</u> แสดงเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Salmonella* ssp. ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง

จากผลการศึกษาพบว่า การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ไม่เป็นอิสระกับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง หรือการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ขึ้นอยู่กับชนิดของ

ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงสูงสุด คือ กลุ่มหอยโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน

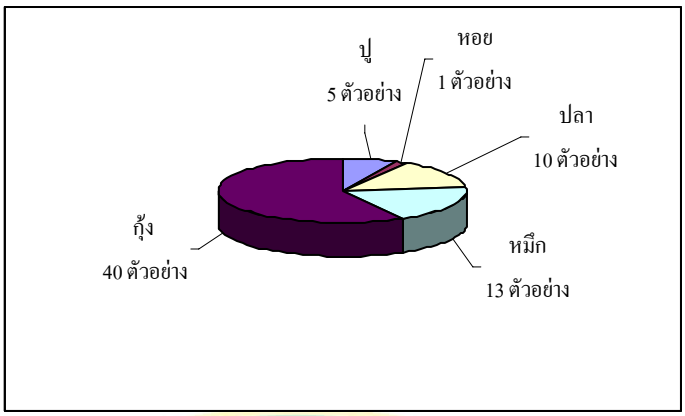
2. จุลินทรีย์กลุ่ม *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา

จุลินทรีย์กลุ่ม *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา

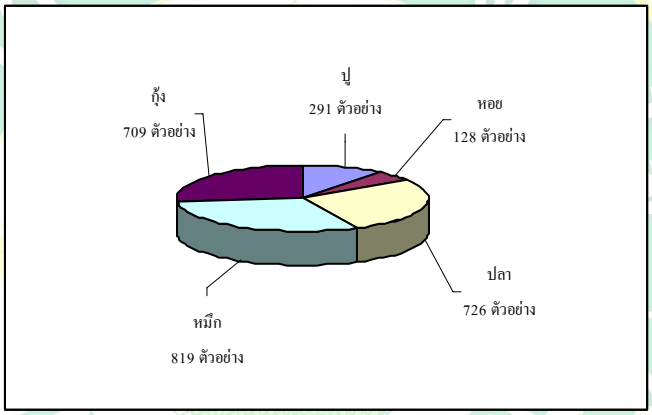
การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงจากแหล่งในเขต 7 จังหวัดภาคใต้ตอนบน จำนวน 2,673 ตัวอย่าง ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ 5 ชนิด คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา ซึ่งผลการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Vibrio cholerae* พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่พบเชื้อ *Vibrio cholerae* มีทั้งหมด 69 ตัวอย่าง โดยแยกตามชนิดสัตว์น้ำต่อไปนี้ คือ กุ้ง หมึก ปู หอย และปลา พบว่า มีปริมาณเท่ากับ 40, 13, 5, 1 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 2 เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 1.69, 1.57, 1.36 และ 0.78 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 6

<u>ตารางที่ 3</u> ปริมาณตัวอย่างการตรวจพบและไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่ม *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง 5 ชนิด

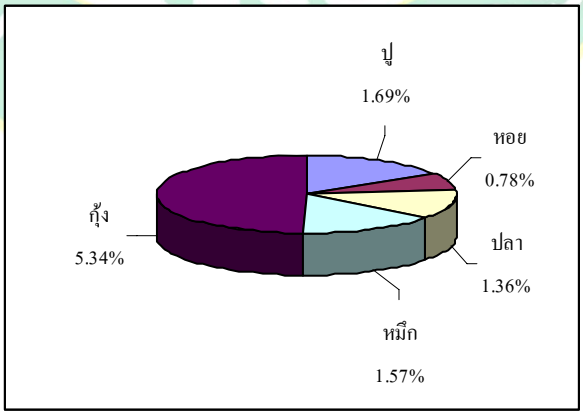
การตรวจเชื้อ	**ชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง**					
Vibrio cholerae	**กุ้ง**	**หมึก**	**ปู**	**หอย**	**ปลา**	**รวม**
ตรวจพบ	40	13	5	1	10	69
ตรวจไม่พบ	709	819	291	128	726	2,673
รวม	**749**	**832**	**296**	**129**	**736**	**2,742**



<u>รูปที่</u> 4 แสดงชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae*



<u>รูปที่ 5</u> แสดงชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ตรวจไม่พบเชื้อ *Vibrio cholerae*



<u>รูปที่ 6</u> แสดงเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *Vibrio cholerae* ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง

จากผลการศึกษาพบว่า การตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* ไม่เป็นอิสระกับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง หรือการตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงสูง คือ กุ้ง โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ปัจจุบันสินค้าอาหารกลุ่มผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงเป็นสินค้าที่ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก สินค้าที่เป็นกลุ่มอาหาร ประเทศต่าง ๆ จะมีการควบคุมมาตรฐานสินค้าเพื่อให้ถูกหลักสุขอนามัย และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทำให้มีการกำหนดมาตรฐานสินค้าสัตว์น้ำ และผลิตภัณฑ์ที่จะส่งออก อาหารทะเลเป็นแหล่งพาหะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเกือบทุกชนิด (Huss, 1997) ซึ่งมาตรฐานทางจุลชีววิทยาเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่จะสามารถบ่งบอกถึงกรรมวิธีการผลิต ตลอดจนแหล่งที่มาของสัตว์น้ำนั้น ๆ มาตรฐานทุกประเทศไม่ยอมให้ตรวจพบเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* ในทุกผลิตภัณฑ์ (พูลทรัพย์ และคณะ, 2546) เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงค่อนข้างสูง Codex (1997) และ Pearson (1995) ได้จำแนกความรุนแรงของอันตรายได้ 3 ระดับ คือ ชนิดอันตรายที่มีความรุนแรงมาก เกิดจาก*Clostridium botulinum, Salmonella thyphi, Shigella dysenteriae, Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157 และ H7, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio vulnificus* ชนิดอันตรายที่มีความรุนแรงปานกลาง เกิดจาก pathogenic เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และ *Streptococcus* type A ชนิดอันตรายที่มีความรุนแรงต่ำ เกิดจาก *Bacillus* spp., *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio parahaemolyticus*

ข้อมูลที่ได้มีลักษณะการจำแนกสองทางโดยมีชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงและการตรวจพบเชื้อเป็นตัวแปร นำผลของปริมาณตัวอย่างที่ได้มาทดสอบสมมติฐานของตารางการจำแนกแบบสองทาง เป็นการทดสอบความเป็นอิสระกันระหว่างลักษณะสองลักษณะ (กัลยา, 2546) โดยใช้สถิติทดสอบไคสแคว์ (Chi-square test) มีสมมติฐานหลักคือการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นอิสระกับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่ตรวจ เมื่อนำผลการตรวจพบเชื้อกับชนิดของผลิตภัณฑ์มาวิเคราะห์ พบว่า การตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* ขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง โดยมีโอกาสตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในสินค้าหอย ปู กุ้ง ปลา และหมึก คิดเป็นร้อยละ 9.57, 3.21, 0.44, 0.27 และ 0.24 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยแล้วโอกาสการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. เท่ากับ 1.31% และโอกาสตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* ในสินค้ากุ้ง ปู หมึก ปลา และหอย คิดเป็นร้อยละ 5.34, 1.69, 1.57, 1.36 และ 0.78 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยแล้วโอกาสการตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* เท่ากับ 2.52 % ซึ่งโอกาสการตรวจพบเชื้อ *Vibrio cholerae* มากกว่าเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นสองเท่า และจากการรายงานของพูลทรัพย์ และคณะ (2546) ในการวิเคราะห์อันตรายที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต

และการกระจายของสัตว์น้ำในธรรมชาติ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio cholerae* ในสัตว์น้ำมาจากแหล่งน้ำหรือแหล่งเพาะเลี้ยง ส่วนในขั้นตอนการผลิตอื่น ๆ เช่น การจับสัตว์น้ำ เรือประมง สะพานปลา ร้านค้า ตลาด ผู้บริโภค และสถานแปรรูป สามารถพบการปนเปื้อนของทั้ง *Vibrio cholerae* และ *Salmonella* spp. เมื่อพิจารณาการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio cholerae* จากการศึกษาในครั้งนี้ พบการปนเปื้อนในสินค้ากุ้งชนิดกุ้งขาววานาไมด์ ซึ่งเป็นกุ้งที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง อีกทั้งเชื้อ *Vibrio cholerae* เป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ในน้ำทะเล และพบการปนเปื้อนได้ทั้งจากคนและสัตว์ (Huss, 1994) Baffone *et al.* (2000) ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลสดพบว่า 13% ของตัวอย่างทั้งหมดเป็น *Vibrio alginolyticus* 81.48%, *Vibrio parahaemolyticus* 14.8% และ *Vibrio cholerae* non O1 3.7% ส่วนการศึกษาของ Hedayat, *et al.* (2002) ในตัวอย่างกุ้งสดที่มาจากฟาร์มเพาะเลี้ยง และจากธรรมชาติ จำนวน 770 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน *Vibrio* spp. 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.1 % ของตัวอย่างทั้งหมด ชนิดที่พบได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio fluvialis* ไม่พบการปนเปื้อนของ *Vibrio cholerae* แต่อย่างใด จะเห็นว่าการตรวจพบ *Vibrio* spp. ในอาหารทะเลสามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป แม้ว่าจะมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์แล้วแต่การแปรรูปบางชนิดไม่สามารถทำลายเชื้อได้ เช่นการแช่แข็งไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Vibrio cholerae* O1 ได้ เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ประมาณ 4-5 สัปดาห์ (Ries *et al.*, 1992)

ส่วนเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ พบการปนเปื้อนสูงในกลุ่มหอยชนิดหอยนางรม ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่อาศัยการกรองอาหารจากน้ำทะเล ซึ่งมีสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แพลงก์ตอนหรือซากอินทรียวัตถุรวมทั้งจุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้รวมอยู่ด้วย (Adams and Moss, 1995) การแพร่เชื้อ *Salmonella* spp. จากมนุษย์และสัตว์ที่เป็นพาหะ คือมีเชื้อแต่ไม่แสดงอาการออกมาเชื้ออาจปะปนมากับสิ่งขับถ่ายของพาหะลงสู่แหล่งเลี้ยงหอยแล้วแฝงตัวอยู่ในโฮสต์ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ และเข้าสู่ตัวหอยในที่สุด อาหารทะเลพบว่ามีโอกาสปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. สูง ในสหรัฐอเมริกาพบสินค้าทะเลที่นำเข้าและปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. 7.4 % ส่วนใหญ่มาจากประเทศกำลังพัฒนาเช่น อินเดีย ไทย ฮ่องกง และสเปน ส่วนสินค้าทะเลจากในประเทศเองปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. เพียง 1.3% (Heinitz *et al.*, 2000)

ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสำคัญต่ออาหารในเรื่องความปลอดภัยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะสินค้าสัตว์น้ำที่ส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพต่อผู้บริโภคโดยตรง และเป็นปัญหาต่อสังคมและเศรษฐกิจในที่สุด เนื่องจากอุตสาหกรรมอาหารและการค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว ถึงแม้ว่า Codex ได้จัดทำข้อกำหนดหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหารและหลักการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุมในการผลิตอาหาร (General Principles of Food Hygiene และ Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP) แต่การได้รับอันตรายจากจุลินทรีย์เหล่านี้ยังขึ้นอยู่กับผู้บริโภคบางกลุ่มมีพฤติกรรมการบริโภคไม่ถูกสุขลักษณะ เช่นการบริโภคสุก ๆ ดิบ ๆ และการเตรียมอาหารที่ขาดสุขลักษณะทำให้เกิดการปนเปื้อนหลังขบวนการผลิตหรือการปนเปื้อนข้ามได้ ซึ่งอันตรายจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคสามารถควบคุมได้โดยการให้ความร้อนเพียงพอในการปรุงอาหาร การเก็บรักษาสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำ และหลีกเลี่ยงหรือป้องกันการปนเปื้อนหลังกระบวนการแปรรูป การตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงสามารถพบเห็นได้ทั่วๆ ไปทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงควรมีการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ก่อนการส่งออกอย่างสม่ำเสมอ

บรรณานุกรม

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2546. **การวิเคราะห์สถิติ** : สถิติสำหรับการบริหารและวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 7. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. 550 หน้า.

กองตรวจสอบและรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. 2549. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.** กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองเศรษฐกิจการประมง. 2544. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย.** กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 87 หน้า.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, กนกพรรณ ศรีมโนภาษ, นิรชา วงษ์จินดา และคณะ. 2546. **ปัญหาสภาพความเสี่ยงในห่วงโซ่อาหารด้านผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.** สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 536 หน้า.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. **ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงของไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพมหานคร. 323 หน้า.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2548. **ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงของไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพมหานคร. 322 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 454 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 436 หน้า.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Adams, M.R. and M.O., Moss. 1995. **Food Microbiology**. The Royal Society of Chemistry. P 194.

Bacteriological analytical manual. 2001. **Chapter 3, Aerobic plate count**. USFDA.

Bacteriological analytical manual. 2003. **Chapter 5, *Salmonella* spp**. USFDA.

Bacteriological analytical manual. 2004. **Chapter 9, *Vibrio spp***. USFDA.

Baffone, W., A. Pianetti, F. Bruscolini, E. Barbieri and B. Citterio. 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology** 54(2000) : 9-18.

Codex Alimentarius Commission, 1997. **Codex Committee on Food Hygiene Supplementary** Volume 1B:1977.

Hedayat, H., C.A. Majid, Y. Rozbeh and R. Vadood. 2002. **Incidence of *Vibrio* spp. In shrimp caught off the south coast of Iran**. Food Control 15(2004) : 187-190.

Heinitz, M.L., R.D. Ruble, D.E. Wagner and S.R. Tatini. 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**. 63 : 579-592.

Huss, H.H. 1994. **Assurance of seafood quality : FAO Fisheries Technical Paper 334**. FAO, Rome. 169 pp.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Huss, H.H. 1997. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control** 8 : 91-98.

Miget, R.J. 1991. **Microbiology of crustacean processing : shrimp, crawfish and prawns**. *In* : D.R. Ward and C. Hackney (eds.) Microbiology of Marine Food Products. An AVI Book, Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 65-87.

Pearson, A.M. 1995. **HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing Advances in Meat Reasearch** Volume10 : 1995.

Ries, A.A., D.J. Vugia, L. Beingolea, A.M. Palacios, E. Vasquez, J.G. Wells, N.G. Baca and D.L. Swerdlow. 1992. Chlolera in Piura, Peru : a modern urban epidemic. **J. Infect. Dis**. 166 : 1429-1433.

ภาคผนวก

ภาคผนวก (ก)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

1. สูตรสถิติการทดอสอบค่าไคสแควร์ (Chi-Squaretest)

$$\chi^2 = \frac{\sum\sum (Oij - Eij)^2}{Eii}$$

โดยที่ $$Eij = \frac{(ri)\,(cj)}{n}$$

Oij คือ ข้อมูลของแถวนอนที่ I และแถวตั้งที่ j

Eij คือ ข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2

ri คือ ผลรวมของแถวนอนที่ i

cj คือ ผลรวมของแถวตั้งที่ j

n คือ ขนาดตัวอย่างทั้งหมด

2. จากตารางที่ 2 ในผลการศึกษานำมาหาข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ได้ดังตารางผนวกที่ 1

<u>ตารางผนวกที่ 1</u> แสดงค่า ข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ของปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp.

การตรวจเชื้อ	**ชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง**					
***Salmonella* spp.**	**กุ้ง**	**หมึก**	**ปู**	**หอย**	**ปลา**	**รวม**
ตรวจพบ	11.88	11.09	4.07	3	9.95	40
ตรวจไม่พบ	898.12	837.91	307.93	227	752.05	3,023
รวม	**910**	**849**	**312**	**230**	**762**	**3,063**

จากตารางผนวกที่ 1 ได้ค่า χ^2 = 149.96 และ $\chi^2_{0.95,4}$ = 9.49 ซึ่งค่า χ^2 > $\chi^2_{0.95,4}$ {องศาอิสระ = (2-1)(5-1) = 4 } จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก

3. จากตารางที่ 3 ในผลการศึกษานำมาหาข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ได้ดังตารางผนวกที่ 2

<u>ตารางที่ผนวก 2</u> แสดงค่า ข้อมูลที่คาดว่าจะอยู่ในระดับที่ I ของลักษณะที่ 1 และอยู่ในระดับที่ j ของลักษณะที่ 2 (Eij) ของปริมาณตัวอย่างที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Vibrio cholerae*

การตรวจเชื้อ	**ชนิดผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยง**					
Vibrio cholerae	**กุ้ง**	**หมึก**	**ปู**	**หอย**	**ปลา**	**รวม**
ตรวจพบ	18.85	20.94	7.45	3.25	18.52	69
ตรวจไม่พบ	730.15	811.06	288.55	125.75	717.48	2,673
รวม	**749**	**832**	**296**	**129**	**736**	**2,742**

จากตารางผนวกที่ 2 ได้ค่า χ^2 = 31.90 และ $\chi^2_{0.95,4}$ = 9.49 ซึ่งค่า χ^2 > $\chi^2_{0.95,4}$ {องศาอิสระ = (2-1)(5-1) = 4 } จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก

ภาคผนวก (ข)

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวสกุลทิพย์ พุทธแก้ว

(ภาษาอังกฤษ) Miss Sakultip Pudkaew

2. เพศ หญิง **วันเดือนปี เกิด** 14 กรกฎาคม 2516

3. ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าพนักงานประมงปฏิบัติงาน

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี

20 / 62 หมู่ 7 ต.ท่าข้าม อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี 84130

โทรศัพท์ 077–274232, 286943, 285807 โทรสาร 077 – 274231

E-mail dadar1@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ. ศ.	วุฒิการศึกษา	สาขาวิชา	สถาบัน
2543	วทบ. (เทคโนโลยีการ เกษตร)	เทคโนโลยีการเกษตร	สถาบันราชภัฏจันทรเกษม
2539	ปทส. ประกาศนียบัตรครูเทคนิค ชั้นสูง	ประมง	วิทยาลัยประมงสงขลาติณสูลานนท์
2537	ปวส.ประกาศนียบัตรวิชาชีพ ชั้นสูง	ประมง	วิทยาลัยประมงสงขลาติณสูลานนท์
2535	ปวช. ประกาศนียบัตรวิชาชีพ	ประมง	วิทยาลัยประมงสงขลาติณสูลานนท์

6. ผลงานวิจัย

ก. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

-การปนเปื้อนของ *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในหอยนางรม บริเวณอ่าวบ้านดอน จ.สุราษฎร์ธานี

ข. ภาระงานในปัจจุบัน

1.งานประจำหัวหน้าฝ่ายตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพ

2.งานวิจัยที่รับผิดชอบในปัจจุบัน

ข้อเสนอการวิจัย	แหล่งทุน
1. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในการแปรรูปเบื้องต้นปูพาสเจอไรซ์	กรมประมง
2. การปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอม (Filth) ในกระบวนการผลิตปูพาสเจอไรซ์	กรมประมง