การกำจัดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในพื้นที่การผลิตหลังผ่านการใช้ความร้อนของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุก

ELIMINATION OF *Escherichia coli* CONTAMINATION IN POST-HEATING AREA OF COOKED PORK PRODUCTS

ธิติมา กุลธีระธวัช

THTITMA KULTEERATAWAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-054-338

การกำจัดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในพื้นที่การผลิตหลังผ่านการใช้ความร้อนของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุก

ELIMINATION OF *Escherichia coli* CONTAMINATION IN POST-HEATING AREA OF COOKED PORK PRODUCTS

ธิติมา กุลธีระธวัช

THTITMA KULTEERATAWAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-054-338

ELIMINATION OF *Escherichia coli* CONTAMINATION IN POST-HEATING AREA OF COOKED PORK PRODUCTS

THTITMA KULTEERATAWAT

A THESIS SUBMITTED IN PATIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2019

KMITL-2019-AI-M-054-338

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การกำจัดการปนเปื้อน *Escherichia coli* ในพื้นที่การผลิตหลังผ่านการใช้ความร้อนของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุก

ELIMINATION OF *Escherichia coli* CONTAMINATION IN POST-HEATING AREA OF COOKED PORK PRODUCTS

ชื่อนักศึกษา นางสาวธิติมา กุลธีระธวัช

รหัสประจำตัว 58608059

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	
รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 12 กรกฎาคม 2562 เวลา 16.00-18.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 25 เดือน กค. พ.ศ. 2562

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง FACULTY OF AGRO-INDUSTRY KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การกำจัดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในพื้นที่การผลิตหลังผ่านการใช้ความร้อนของผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุก

นักศึกษา นางสาวธิติมา กุลธีระธวัช

รหัสนักศึกษา 58608059

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

พ.ศ. 2562

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในกระบวนการแปรรูปเนื้อสัตว์เป็นปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายแก่ผู้ผลิตและมีโอกาสปนเปื้อนไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายแก่ผู้บริโภค วิทยานิพนธ์ฉบับนี้นำเสนอการประยุกต์ใช้วิธี phylogenetic group ในการจำแนกแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในโรงงานผลิตสุกรปรุงสุกแห่งหนึ่ง เพื่อใช้ในการติดตามแหล่งการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมไปสู่ผลิตภัณฑ์ และนำไปสู่การลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ตั้งแต่กระบวนหลังการให้ความร้อนไปจนถึงหลังแช่เยือกแข็งจำนวน 100 ตัวอย่าง และพื้นผิวสิ่งแวดล้อม ได้แก่ มือพนักงาน อุปกรณ์ เครื่องจักร และพื้นผนัง จำนวน 560 ตัวอย่าง มาตรวจเชื้อ *E. coli* และนำไปจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี phylogenetic group ที่แบ่งเชื้อ *E. coli* ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ A, B1, B2 และ D ซึ่งจากผลการตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในทุกขั้นตอนการผลิต แต่ยังคงพบเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวสิ่งแวดล้อม ได้แก่ รถเข็นที่ใช้ขนถ่ายส่วนผสม (ร้อยละ 20) และพื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลว (ร้อยละ 45) เชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบทั้ง 2 บริเวณเป็นสายพันธุ์เดียวกันโดยจัดอยู่ใน phylogroup A โดยพบว่าปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในพื้นผิวของรถเข็นมีสาเหตุมาจากวิธีฆ่าเชื้อรถเข็นในปัจจุบันไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จึงทดลองปรับปรุงวิธีการฆ่าเชื้อรถเข็นโดยใช้การฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (steam pasteurization) ที่อุณหภูมิ 85, 90 และ 95°C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 85°C ระยะเวลา 60 วินาที มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตได้ จึงช่วยลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนข้ามเชื้อ *E. coli* ไปสู่ผลิตภัณฑ์ได้เช่นเดียวกัน

Thesis Title	Elimination of *Escherichia coli* contamination in post-heating area of cooked pork products
Student	Ms. Thitima Kulteeratawat
Student ID	58608059
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2019
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

Escherichia coli was often found in meat processing area and many products were rejected and contaminated to consumers. This thesis was to apply phylogenetic group technique to track source of contamination of *E. coli* in a cooked pork processing plant and reduce the contamination of *E. coli* in the production environment effectively. A total of 100 heating and freezing products and 560 swab samples from hands, equipments, machines and environmental surfaces in post-heating area were screened in the presence of *E. coli*. The positive isolates were analyzed by using molecular technique and determined *E. coli* into four main phylogenetic groups as A, B1, B2 and D. *E. coli* were found only on environmental surfaces and not found in any products. All *E. coli* isolates were detected from stainless handcart (20%) and surface of floor in ingredient mixing room (45%). *E. coli* strains, isolated from both sources, were determined into same phylogenetic group as A. This finding showed that the sanitizing method of stainless handcarts should be revised. Therefore, the steam pasteurization was studied to reduce the contamination of *E. coli* on stainless handcarts at 85, 90 and 95^{o}C for 60, 90 and 120 seconds, respectively. The results showed that steam pasteurization at the temperature of 85^{o}C for 60 seconds was effective enough to reduce contamination of *E. coli* at surface of stainless handcart which also reduced the opportunity for *E. coli* contamination in products.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะ ช่วยแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดจนให้ความรู้ที่ดีแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณคณาจารย์เจ้าหน้าที่ และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท คณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกสาขา คุณวิไลลักษณ์ จั่นจำรูญ คุณวิภาวี ใยโพธิ์ทอง ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และการอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณผู้บังคับบัญชาที่ให้ลาศึกษาต่อ รวมไปถึงผู้ใต้บังคับบัญชาและเพื่อนร่วมงานของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดีและคอยสนับสนุนข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนของข้าพเจ้า คุณปวีณา คำมี คุณยุวธิดา นาดอน คุณกุลณัฐฐา ป้อมบุบผา ที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดีและคอยสนับสนุนข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ที่สำคัญที่สุดขอขอบคุณบิดา มารดา ครอบครัว และคุณเจษฎาพร สุพิชยา สามี ที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และคอยดูแลข้าพเจ้าเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ธิติมา กุลธีระธวัช

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……...II

กิตติกรรมประกาศ……...III

สารบัญ……...……IV

สารบัญตาราง……...…….…...VI

สารบัญภาพ...……..……..…….....VIII

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Escherichia coli*.....5

2.2 การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*.....8

2.3 การควบคุมและยับยั้งเชื้อ *E. coli*.....13

2.4 เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....19

2.5 การประยุกต์ใช้วิธีทางอณูวิทยา (molecular method)
เพื่อค้นหาแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*.....24

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....29

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....29

3.3 เครื่องมือ.....29

3.4 อุปกรณ์.....30

3.5 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง.....30

3.6 วิธีการทดลอง..... 31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก.....38

4.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก.....39

4.3 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก.....44

4.4 การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง..... 46

4.5 การลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกเยือกแข็ง.....48

4.6 ผลของไอน้ำต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้กระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกเยือกแข็ง.....52

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง.....57

5.2 ข้อเสนอแนะ.....58

บรรณานุกรม.....59

ภาคผนวก ก.....65

ภาคผนวก ข.....69

ภาคผนวก ค.....71

ประวัติผู้เขียน.....73

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ของ *E. coli*.....6

2.2 ความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในฟาร์มโคนม โรงงานผลิตนม และโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์.....10

2.3 การให้ความร้อนในการปรุงอาหารประเภทเนื้อวัวบดเพื่อทำลายเชื้อ *E. coli* O157:H7 ตามคำแนะนำของ ACMSF.....13

2.4 ค่า D value สำหรับการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ STEC serotype อื่นๆในเนื้อสุกร เนื้อโค และเนื้อสัตว์ชนิดอื่น.....14

2.5 ผลการใช้สารฆ่าเชื้อ 4 ชนิดเพื่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 5 ºC.....18

2.6 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของกรมปศุสัตว์และประเทศญี่ปุ่นสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสุกร ปรุงสุกแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออก..... 23

2.7 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและ ภาชนะสัมผัสอาหารประเภทพื้นผิวสัมผัส.....24

2.8 เกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเพื่อควบคุมคุณภาพ ภายในโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกเยือกแข็งส่งออก..... 24

3.1 บริเวณเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของ การปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์.....33

3.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และในกระบวนการผลิต เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มาประเมินความสอดคล้อง โดยวิธี phylogenetic group.....35

4.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการ ผลิตบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงมีนาคม พ.ศ. 2561.....39

4.2 ผลการตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลัง กระบวนการให้ความร้อน ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม พ.ศ.2561.....42

4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตามวิธี phylogenetic group..45

4.4 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในพื้นผิวของสิ่งแวดล้อม ในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก..... 45

4.5 ผลการตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปรถเข็นในแต่ละขั้นตอนการล้าง ทำความสะอาดฆ่าเชื้อโดยวิธีที่ผู้ผลิตใช้ในปัจจุบัน.....48

4.6 ผลการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียวิธีการฆ่าเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็นระหว่างการปรับความถี่ในการทำความสะอาดโดยวิธีการเดิม การใช้สารฆ่าเชื้อและการฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ..... 50

4.7 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อน ของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็น.....53

4.8 ผลของอุณหภูมิและเวลาโดยการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อนของ จุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ในรถเข็น.....54

4.9 ผลของอุณหภูมิและเวลาโดยการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อนเชื้อ coliforms ในรถเข็น.....55

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 เชื้อ *Escherichia coli*.....5

2.2 แหล่งของเชื้อ *E. coli* ที่พบในสิ่งแวดล้อม.....9

2.3 ร้านค้าปลีกจำหน่ายเนื้อสัตว์ในเมืองการาจี ประเทศปากีสถาน.....12

2.4 อาหารที่ถูกปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปัง เนื้อหมูชุบเกล็ดขนมปังทอด หรือ tonkatsu (ก) แซนวิชจากเนื้อหมูชุบเกล็ดขนมปังทอด (ข) ข้าวหน้าหมูทอดตุ๋น หรือ katsudon (ค) ข้าวราดแกงกะหรี่หมู (ง)..... 20

2.5 แผนผังพื้นที่การผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งแห่งหนึ่ง.....21

2.6 แผนผังพื้นที่การผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งแห่งหนึ่ง.....22

2.6 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ E. coli โดยวิธีการ phylogenetic group (ช่องที่ 1 และ 2 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup A, ช่องที่ 3 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup B1, ช่องที่ 4 และ 5 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup D และ ช่องที่ 6 และ 7 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup B2).....27

4.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน (ก) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกแป้ง (ข) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกน้ำแป้งเหลว (ค) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกเกล็ดขนมปัง (ง) และผลิตภัณฑ์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง (จ).....39

4.2 สายพานลำเลียง (ก) เครื่องคลุกแป้ง (ข) เครื่องคลุกน้ำแป้ง (ค) พื้นที่โซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง.....40

4.3 เครื่องคลุกเกล็ดขนมปัง (ก) เครื่องผสมน้ำแป้ง (ข) มือพนักงาน (ค) พื้นที่โซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง.....41

4.4 รถเข็น (ก) เครื่องชั่ง (ข) ตู้ควบคุมเครื่องจักร (ค) พื้นที่โซนที่ 2 พื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง.....41

4.5 ผนัง (ก) พื้นห้อง (ข) รางสายไฟ (ค) พื้นที่โซนที่ 3 พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์.....41

4.6 การล้างรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิต เริ่มจากขัดล้างด้วยฟองน้ำและน้ำสบู่ (ก) ล้างคราบสบู่ด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (ข) และฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C (ค)....44

4.7 การใช้รถเข็นในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุก เริ่มจากรถเข็นขนย้ายส่วนผสมมายังห้องผสมน้ำแป้ง (ก) รถเข็นขนย้ายถังบรรจุน้ำแป้งที่ผสมแล้วไปยังพื้นที่การผลิต (ข) และ (ค) และการเทน้ำแป้งเหลวลงในเครื่องคลุกน้ำแป้ง(ง).....47

4.8 การฆ่าเชื้อรถเข็นโดยการใช้ไอน้ำจากตู้นึ่งไอน้ำ (Box steamer)..... 52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อุตสาหกรรมแปรรูปอาหารไทยเป็นอุตสาหกรรมการผลิตที่มีขีดความสามารถการแข่งขันในการส่งออกสูงโดยในปี พ.ศ. 2558 ภาพรวมมูลค่าการส่งออกอาหารแปรรูปไทยอยู่ที่ 17,322.36 ล้านเหรียญสหรัฐฯ หรือคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 3.2 ของมูลค่าการส่งออกอาหารแปรรูปทั่วโลก ด้วยการผลิตที่ได้มาตรฐานและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล ส่งผลให้ไทยกลายเป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารอันดับต้นๆ ของโลก (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2559) อย่างไรก็ตามความต้องการของผู้บริโภคและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ของประเทศคู่ค้านั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ส่งผลให้ผู้ประกอบการจำเป็นต้องพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตและรักษามาตรฐานของผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ดำเนินการค้าได้อย่างยั่งยืนในอนาคต (สมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก , 2558)

ในปัจจุบันประเด็นเรื่องความปลอดภัยของอาหารเป็นสิ่งที่ทั่วโลกให้ความสำคัญ ซึ่งประเทศผู้นำเข้านำมาใช้ยกอ้างเพื่อเป็นข้อจำกัดทางการค้ามากขึ้น จึงเป็นเรื่องจำเป็นที่ผู้ประกอบการธุรกิจอาหารต้องมีการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้านั้นๆ กฎหมายสำหรับส่งออกอาหารไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา (Federal Food, Drugs, and Cosmetic Act : FD & C Act) หรือ กฎหมายสุขอนามัยอาหารของญี่ปุ่น (Food Sanitation Law) เป็นต้น นอกจากนี้กรมปศุสัตว์กำหนดให้โรงงานอุตสาหกรรมที่จะส่งออกอาหารประเภทเนื้อสัตว์ไปต่างประเทศต้องมีการดำเนินการตามหลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices: GMP) และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ซึ่งเป็นระบบประกันคุณภาพของอาหารเพื่อลดความเสี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษไปสู่ผู้บริโภค อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงงานแปรรูปอาหารอยู่เสมอ จากการสัมภาษณ์ผู้ผลิตเนื้อสัตว์ปรุงสุกแช่แข็งส่งออกรายหนึ่ง พบว่าสูญเสียรายได้จากการปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* ในสินค้าเป็นมูลค่ากว่าห้าล้านบาทในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliforms) มักถูกใช้เป็นดัชนีชี้วัดปัญหาการปนเปื้อนจากควบคุมสุขอนามัยที่

ไม่ดีในกระบวนการผลิต โดยเชื้อ *E. coli* มีอยู่ตามธรรมชาติในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ พบว่าเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ เช่น เชื้อ *E. coli* O157:H7 ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อมนุษย์ ไม่ใช่แค่เพียงทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรงเท่านั้น แต่ยังทำให้เกิดโลหิตเป็นพิษ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ไตอับเสบ ไตวาย หรืออาจถึงแก่ชีวิตได้ (วฤษณี, 2554) โดยในปี ค.ศ. 1996 ได้มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ครั้งใหญ่ในประเทศญี่ปุ่น ทำให้มีผู้ป่วย 9,578 คน และเสียชีวิต 11 คน (WHO, 1996) จากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7

โดยปกติเชื้อ *E. coli* สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อน เช่น การพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิมากกว่า 70°C (วรวุฒิ, 2557) อย่างไรก็ตามยังมีอาหารบางประเภท เช่น อาหารพร้อมปรุง (ready-to-cook food) เป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมาในระดับหนึ่งและไม่ถูกนำไปให้ความร้อนก่อนทำการแช่แข็ง ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* โดยในปี ค.ศ. 2009 มีผู้ป่วยจำนวน 69 ราย ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการนำแป้งคุ้กกี้แช่แข็งที่ไม่ผ่านการอบร้อนจากผู้ผลิต (uncooked cookie dough products) มาให้ความร้อนโดยผู้บริโภคเองก่อนรับประทาน พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ Salmonella ในคุ้กกี้ดังกล่าว (Marler, 2013) และข้อมูลจากการผลิตอาหารพร้อมปรุงเพื่อส่งออกต่างประเทศของโรงงานแห่งหนึ่ง พบว่าสินค้าบางประเภท เช่น เนื้อสัตว์ปรุงสุกชุบเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็ง (frozen steamed-breaded meat) มีกระบวนการผลิตโดยนำเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อสุกร หรือ เนื้อไก่ มาหมักและหั่นให้เป็นชิ้น จากนั้นนำมาผ่านความร้อน (thermal processing) เพื่อให้ชิ้นเนื้อสุก นำไปชุบแป้งเหลวและเกล็ดขนมปัง แล้วนำไปแช่แข็ง บรรจุในบรรจุภัณฑ์และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การที่ผลิตภัณฑ์หลังชุบแป้งเหลวและเกล็ดขนมปังไม่ถูกนำไปผ่านการให้ความร้อนซ้ำนั้น เนื่องจากเป็นคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคจะต้องนำผลิตภัณฑ์ไปทอดเพื่อให้เกล็ดขนมปังมีความกรอบก่อนนำไปรับประทานและเพื่อให้เกิดรสสัมผัส (texture) ที่ดีของผลิตภัณฑ์ ซึ่งขั้นตอนการผลิตในช่วงภายหลังจากการให้ความร้อนแก่ชิ้นเนื้อ มักพบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยาของอาหารที่กำหนด (กรมปศุสัตว์, 2551) และส่งผลต่อการยอมรับของประเทศคู่ค้าและทำให้เกิดความเสียหายเป็นมูลค่ามหาศาลได้

ดังนั้นผู้ผลิตจึงให้ความสำคัญกับการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในกระบวนการผลิตอาหารเนื้อสัตว์ปรุงสุกชุบเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็ง แต่การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในโรงงานนั้นมีแหล่งที่มาของเชื้อ *E. coli* หลากหลาย ทำให้การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อนี้สู่ผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก ซึ่งในปัจจุบันการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในระดับอุตสาหกรรมเป็นการวิเคราะห์ในระดับ

สปีชีส์ (species) เท่านั้น อาจใช้วิธีวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ที่สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว (rapid method) เช่น การใช้แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates หรือ การวิเคราะห์แบบดั้งเดิม (conventional method) เช่น วิธี Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria (Bacteriological Analytical Manual : BAM) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 วิธีไม่สามารถจำแนกเชื้อ *E. coli* ในระดับสายพันธุ์ได้ หากพบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ทั้งในผลิตภัณฑ์อาหารและการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต จะไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการของปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมไปสู่อาหารได้ การแก้ปัญหาในปัจจุบันจึงอาจจะไม่ตรงประเด็นกับปัญหาการปนเปื้อนที่แท้จริง จึงมีความสนใจในการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular method) ได้แก่ phylogenetic group โดยอาศัยความจำเพาะของสารพันธุกรรมในการจำแนกแหล่งของการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง เพื่อติดตามแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมไปสู่ผลิตภัณฑ์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งและสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต

1.2.2 จำแนกและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งและสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตโดยใช้วิธี phylogenetic group เพื่อติดตามแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมไปสู่ผลิตภัณฑ์

1.2.3 เพื่อศึกษาวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* โดยการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งและสวอป (swab) พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตในขั้นตอนหลังการทำสุกจนถึงการทำเยือกแข็งของโรงงานผลิตอาหารพร้อมปรุงเพื่อส่งออกต่างประเทศแห่งหนึ่ง จากนั้นประยุกต์ใช้วิธี phylogenetic group เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยอาศัยความจำเพาะของสารพันธุกรรม ในการติดตามแหล่งการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จากสิ่งแวดล้อมไปสู่ผลิตภัณฑ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงแหล่งของการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งและกระบวนการผลิต

1.4.2 สามารถติดตามการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ภายในพื้นที่การผลิตได้

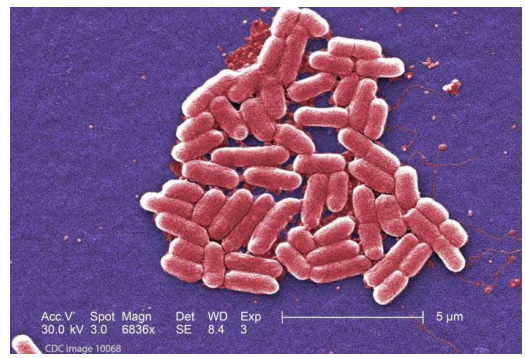
1.4.3 นำไปใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในพื้นที่การผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ

1.4.4 ใช้เป็นแนวทางการติดตามการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆในโรงงานได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli (*ภาพที่ 2.1) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้าง spore มีขนาด 1.1 – 1.5 x 2.0 – 6.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และจัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น



ภาพที่ 2.1 เชื้อ *Escherichia coli*
ที่มา: Larsen (2017)

นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Theodor Escherich สามารถแยกเชื้อ *E. coli* ได้ครั้งแรกจากอุจจาระของเด็กที่มีอาการท้องร่วงในปี ค.ศ. 1885 ต่อมาเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้รับการตั้งชื่อเป็น *Escherichia coli* (วฤษณี, 2554) เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นจึงมักใช้เป็นดัชนีวัดสุขลักษณะของอาหารและน้ำ เชื้อ *E. coli* จัดเป็นแบคทีเรียประเภท mesophile สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้ในที่อุณหภูมิ 15 – 45 ^{o}C โดยมีภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตมากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 5.0 – 9.0 (Garrity, 2005) โดยเมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสมจะมีระยะเวลาการแบ่งตัว (generation time) ประมาณ 15 - 20 นาที สำหรับการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อ *E. coli* จากแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ชนิดอื่น สามารถทดสอบได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ของ *E. coli*

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
Indole production	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Motility test	+/-
Lysine decarboxylase test	+
TSI	A/A, G^+
H_2S	-
Urea hydrolysis	-
Acetate utilization	+
ONPG test	+
Lactose fermentation	+
Sucrose fermentation	+/-
Mannitol fermentation	+
Raffinose	+/-
Gelatin (22 ^oC)	-

+ คือ ปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวก, - คือปฏิกิริยาให้ผลเป็นลบ

A/A คือ acid butt / acid slant

G^+ คือ เกิด gas , G^- คือ ไม่เกิด gas

ที่มา : Forbes และคณะ (2007)

สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของเชื้อ *E. coli* ไม่ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรง แต่บางสายพันธุ์ เช่น เชื้อ *E. coli* ที่สร้าง Shiga like toxins สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รุนแรงมากได้ (WHO, 2017) นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เชื้อ *E. coli* ถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เนื่องจากพบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในเนยแข็งที่นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้มีผู้ป่วยเกือบ 400 คน (วฤษณี, 2554) ถัดมาในปี ค.ศ. 1975 กองควบคุมโรคติดต่อประเทศสหรัฐอเมริกา (Center of disease control, CDC) ได้ตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการปวดท้องอย่างรุนแรง และถ่ายเป็นมูกเลือด จากนั้นใน ค.ศ. 1982 ได้มีการยืนยันว่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 เป็นสาเหตุของโรค hemorrhagic colitis ซึ่งต่างจากการปวดท้องธรรมดา

การจำแนกเชื้อ *E. coli* ตามกลไกของการก่อโรค แบ่งได้เป็น 6 ประเภท ดังนี้ (Ciara และคณะ, 2017)

กลุ่มที่ 1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน โดยมี 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่ทนความร้อน (Heat stable toxins - ST) และ ประเภทที่ไม่ทนความร้อน (Heat-labile toxins - LT) โดยเมื่อได้รับเชื้อ ETEC เข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์และหลั่งสารพิษออกออกมา ซึ่งกระตุ้นให้ลำไส้บีบตัวและขับของเหลวออกมาเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดอาการท้องเสีย ท้องร่วง ปวดเกร็งในช่องท้อง มีไข้ คลื่นไส้หรืออาเจียน หนาวสั่น เบื่ออาหาร และเวียนศีรษะ โดยอาการเจ็บป่วยจะเกิดขึ้น หลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย 24-72 ชั่วโมง โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยสามารถฟื้นตัวได้โดยไม่ต้องพักรักษาตัวที่โรงพยาบาลหรือใช้ยาปฏิชีวนะ (CDC, 2014)

กลุ่มที่ 2 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่มักติดเชื้อในเด็กเล็ก ก่อให้เกิดอุจจาระร่วงที่ไม่เป็นมูกเลือด โดยเชื้อสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวของผนังลำไส้ได้เป็นอย่างดี การจับเกาะของเซลล์ที่บริเวณเยื่อบุผิวมีลักษณะการจับกันเป็นกลุ่ม (aggregative adherence) (มณฑลและชัยสิทธิ์, 2554) และเชื้อ EAEC สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซิน ที่เรียกว่า EAST (EnteroAggregative ST) toxin และสร้าง hemolysin ที่ทำให้เกิดการการติดเชื้อ ในทางเดินปัสสาวะ (Todar, 2008)

กลุ่มที่ 3 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ให้เกิดอาการท้องร่วง อาจมีอาการถ่ายเป็นมูกเลือด โดยมักเกิดขึ้นกับทารกในประเทศที่กำลังพัฒนา (Todar, 2008) แต่ไม่ใช่เป็นผลมาจากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน จากการศึกษาพบว่าเชื้อ EPEC ทำให้เกิดโรคโดยการเกาะติดเฉพาะที่กับเซลล์ของเนื้อเยื่อในลำไส้ ทำให้เกิดการรวมตัวกับเยื่อเมือก จากนั้นเชื้อ EPEC จะเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้น แล้วมีการขับสารประเภทโปรตีนออกมายับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาว (วฤษณี, 2554)

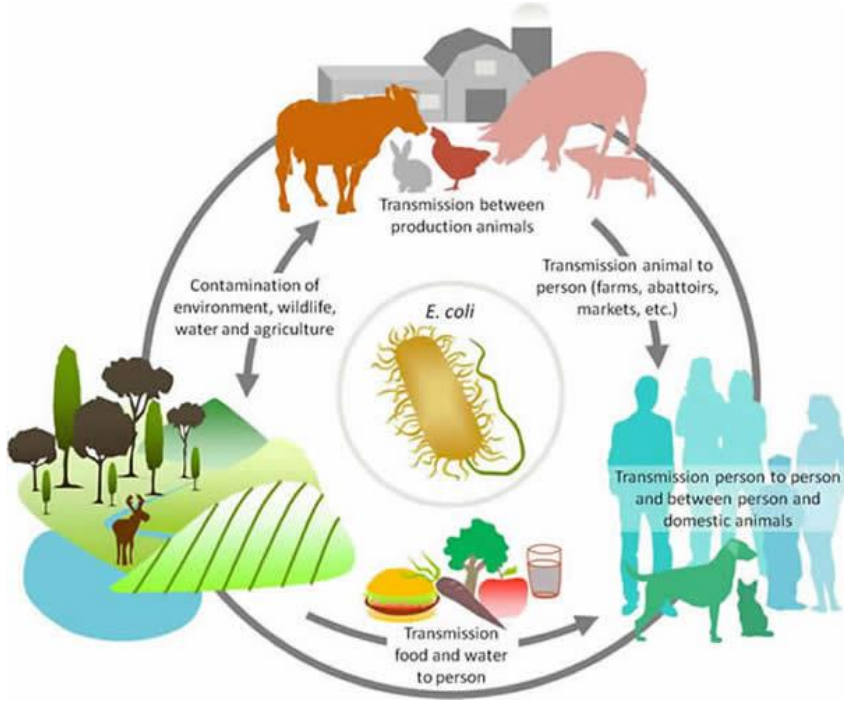
กลุ่มที่ 4 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซิน มีกลไกในการก่อโรคที่คล้ายกับเชื้อ *Shigella dysenteriae* เนื่องจากสามารถบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ (highly invasive) เพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์และทำให้เซลล์ถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดโรคท้องร่วงที่มีลักษณะคล้ายกับการเป็นบิด (มณฑลและชัยสิทธิ์, 2554) ทั้งแบบที่ถ่ายมีเลือดปนและไม่มีเลือดปน ใช้ระยะเวลาฟักตัวนาน 2 – 48 ชั่วโมง (เฉลี่ย 18 ชั่วโมง) มักพบในเด็กทารกและคนชรา เชื้อ EIEC เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์แรกที่พบว่าทำเกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยเกิดการระบาดขึ้นครั้งแรกในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1947 เกิดขึ้นกับนักเรียนในโรงเรียนแห่งหนึ่งที่บริโภคปลาแซลมอน (วฤษณี, 2554)

กลุ่มที่ 5 Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) เชื้อ *E. coli* ในกลุ่มนี้มีสมาชิกในกลุ่มที่หลากหลาย และมี virulence factor แตกต่างกัน เชื้อ DAEC สามารถเกาะติดผิวเซลล์เยื่อบุแบบกระจาย โดยมีรายงานว่าเชื้อกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (มณฑลและชัยสิทธิ์, 2554) ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการท้องเสียหรือถ่ายเหลว อย่างไรก็ตาม กลไกการก่อโรคยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน (Ciara et al., 2017)

กลุ่มที่ 6 Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือเรียกว่า Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารพิษของชิเกลลา (shiga like toxins) และเป็นสารพิษประเภทเวอโรทอกซิน (verotoxin) หรือ เวอโรไซโตทอกซิน (verocytotoxin) สารพิษของ EHEC มี 2 แบบ คือ STL-I (หรือ VT-I) และ SLT-II (หรือ VT-II) ในปัจจุบันใช้ศัพท์ใหม่ว่า Stx_1 และ Stx_2 ตามลำดับ (วฤษณี, 2554) สายพันธุ์ที่พบการระบาดบ่อยที่สุดได้แก่ serotype O157:H7 (จันทร์เพ็ญ, 2554) อาการรุนแรงที่พบ ได้แก่ ถ่ายเหลวเป็นมูกเลือด และอาจมีอาการเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic uremic syndrome, HUS) ซึ่งนำไปสู่ไตวายได้ มักพบในเด็กเล็กและคนชรา โดยอาการอื่นที่พบได้แก่ ช่องท้องบิดเกร็งอย่างรุนแรง อาเจียน อาจมีไข้แต่จะมีไข้ไม่สูงมาก (น้อยกว่า 38.5^{o}C) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะรักษาหายได้ภายใน 5-7 วัน อย่างไรก็ตามพบว่าร้อยละ 5 - 10 ของผู้ที่ได้รับเชื้อ EHEC จะมีอาการของ HUS ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอ่อนเพลียมาก ผิวหนังซีด ซึ่งมีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยแพทย์ เนื่องจากมีความเสี่ยงที่เกิดภาวะไตหยุดทำงาน ไตวาย และอาจทำให้เสียชีวิตได้ (CDC, 2015)

2.2 การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*

เชื้อ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น เช่น สุกร โค กระบือ เป็นต้น ดังนั้น เชื้อจะถูกขับผ่านออกมากับอุจจาระสัตว์ได้ ถ้าสัตว์ถ่ายอุจจาระลงดินหรือแหล่งน้ำ ซึ่งใช้เป็นแหล่งเพาะปลูกหรืออุปโภค บริโภค (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557) ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แหล่งของ *E. coli* ที่พบในสิ่งแวดล้อม

ที่มา : The Reference Laboratory for *E. coli* (2004)

มีรายงานของ Schlegelova และคณะ (2010) พบเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในวัตถุดิบนมหรือเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู หรือ เนื้อไก่ และบางครั้งในโรงงานแปรรูปอาหาร โดยเฉพาะพื้นผิวที่ชื้นแฉะ พบว่ามีการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งสามารถทนทานต่อสารฆ่าเชื้อมากกว่าแบคทีเรียทั่วไป ทำให้อาจมีแบคทีเรียหลงเหลือบริเวณผิวหน้าของเครื่องจักรจากการล้างทำความสะอาดปกติได้ จึงได้เก็บตัวอย่างวัตถุดิบอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหาร และพื้นที่สัมผัสอาหารหลังผ่านกระบวนการล้างทำความสะอาดทั้งหมดในฟาร์มโคนมทั้งหมด 3 ฟาร์ม จำนวน 120 ตัวอย่าง โรงงานผลิตนมทั้งหมด 1 โรงงาน จำนวน 124 ตัวอย่าง และโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ทั้งหมด 2 โรงงาน จำนวน 160 ตัวอย่าง ในระหว่างปี ค.ศ. 2005 – 2006 เพื่อตรวจหาเชื้อ *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., และ *E. coli* พบว่ามีความชุกของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจหา ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในฟาร์มโคนม โรงงานผลิตนม และโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์

กลุ่ม	ชนิดของตัวอย่าง	พื้นผิว	ตัวอย่างทั้งหมด	ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli*	
				จำนวน	ร้อยละ
1.ฟาร์มโคนม	น้ำนมดิบ		12	9	75
	สวอป	ด้านใน	108	9	8
2.โรงงานผลิตผลิตภัณฑ์จากนม	วัตถุดิบ		24	12	50
	สวอป	ด้านใน	35	0	0
	สวอป	พื้นที่เปิด	20	4	20
	น้ำนมที่ผ่านการพลาสเจอไรซ์		48	9	19
3.โรงงานแปรรูปเนื้อสุกร	วัตถุดิบ		20	15	75
	สวอป	พื้นที่เปิด	40	18	45
	ผลิตภัณฑ์		20	6	0
4.โรงงานแปรรูปเนื้อไก่	วัตถุดิบ		16	15	94
	สวอป	พื้นที่เปิด	40		
	หลังฆ่าเชื้อ 10 ซม.			26	65
	หลังฆ่าเชื้อ 4 ซม.			6	15
	ผลิตภัณฑ์		24	9	38

ที่มา : Schlegelova และคณะ (2010)

จากการเก็บตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 ฟาร์มโคนม มีการ swab อุปกรณ์ที่ใช้ เช่น กรง สายท่อนม พบว่ามีความชุกของการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* น้อยกว่าที่พบในน้ำนมดิบเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม พบว่าบริเวณที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบแบคทีเรียทั่วไป (total number of aerobic mesophile microorganisms : TCM) ร่วมด้วยในตัวอย่างเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยพบ TCM ที่จำนวนไม่ต่ำกว่า 10^5 cfu การเก็บตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 โรงงานผลิตผลิตภัณฑ์จากนม มีการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพลาสเจอไรซ์ รวมไปถึงมีการ swab อุปกรณ์บริเวณภายใน เช่น อุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อนหลังพลาสเจอไรซ์ ถังเก็บนมที่ผ่านการพลาสเจอร์ไรซ์ และอุปกรณ์ที่มีพื้นผิวเปิด เช่น สายพานลำเลียงชีส เขียงตัดชีส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพลาสเจอไรซ์มีความสัมพันธ์กับอุปกรณ์ที่สัมผัสหลังผ่านการให้ความร้อน

โดยพบการปนเปื้อนเชื้อในระดับที่สูงประมาณ 10^3 - 10^6 cfu / 100 ตารางเซนติเมตร บริเวณสายพานลำเลียงชีสที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ที่พบในโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์จากนมมักปนเปื้อนเชื้อในขั้นตอนหลังผ่านการให้ความร้อน การเก็บตัวอย่างในกลุ่มที่ 3 โรงงานแปรรูปเนื้อสุกร พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ถึงร้อยละ 49 โดยมีการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบ เช่น การ swab ซากของเนื้อสุกร รวมไปถึงอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในกระบวนการผลิต เช่น ที่แขวนซาก โต๊ะตัดแต่ง สายพานลำเลียง มีด และรถเข็น เป็นต้น มีการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อดิบที่ผ่านการตัดแต่งเพื่อเตรียมขายและไส้กรอกที่ผ่านการให้ความร้อน พบว่าในวัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ก่อนให้ความร้อนมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* โดยเฉพาะโต๊ะตัดแต่งและมีด มีการปนเปื้อน TCM ร่วมด้วยในระดับ 10^6 - 10^7 cfu / 100 ตารางเซนติเมตร จากการตรวจผลิตภัณฑ์ไม่พบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างไส้กรอกที่ผ่านการให้ความร้อน แต่พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง Shiga like toxin ในเนื้อดิบที่ผ่านการตัดแต่งเพื่อเตรียมขาย จำนวน 1 ตัวอย่าง และสำหรับการเก็บตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 โรงงานแปรรูปเนื้อไก่ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ถึงร้อยละ 63 ผลที่ได้พบว่ามีความใกล้เคียงกับโรงงานแปรรูปเนื้อสุกร คือพบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในเนื้อไก่ที่ผ่านการให้ความร้อนลดต่ำลงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบเนื้อไก่และอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการก่อนให้ความร้อน (Schlegelova et al., 2010)

นอกจากนี้ มีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรครวมไปถึงเชื้อ *E. coli* ในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อสุกร เนื้อกระบือ เนื้อโค จำนวน 84 ตัวอย่างในโรงฆ่าสัตว์และสถานที่จำหน่ายในจังหวัดแม่ฮ่องสอน โดยเป็นเนื้อไก่จากโรงฆ่าสัตว์ 4 ตัวอย่าง เนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ 49 ตัวอย่างและจากสถานที่จำหน่าย 27 ตัวอย่าง เนื้อกระบือจากสถานที่จำหน่าย 2 ตัวอย่าง เนื้อโคจากโรงฆ่าสัตว์ 1 ตัวอย่างและจากสถานที่ 2 ตัวอย่าง จากผลการตรวจสอบพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ทั้งหมดร้อยละ 13.1 และพบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างเนื้อสุกรเท่านั้น ซึ่งอาจมาจากเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบเป็นเนื้อสุกร มีการเก็บตัวอย่างเนื้อสัตว์ชนิดอื่นเพียงเล็กน้อยในงานวิจัยนี้ โดยสาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ในโรงฆ่าสัตว์มาจากการขาดการควบคุมสุขลักษณะที่ดีทั้งในส่วนของผู้ปฏิบัติงานและสถานที่ปฏิบัติงาน (ปภาสพงษ์ และสุภลักษณ์, 2556)

การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* สามารถเป็นตัวชี้วัดถึงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิต เช่น กระบวนการทำความสะอาดหรือการฆ่าเชื้อได้มาตรฐานเพียงพอหรือไม่ หรือมีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลในกระบวนการผลิต ซึ่งอาจมาจากวัตถุดิบ สิ่งแวดล้อม หรือผู้ปฏิบัติงาน อาจใช้การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในการอนุมานถึงแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ ด้วย เช่น หากพบเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ก็อาจมีแนวโน้มที่จะพบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเป็นต้น (Ashbolt et al., 2001)

และมีรายงานของ Ali และคณะ (2010) ในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์และพื้นผิวสิ่งแวดล้อมบริเวณร้านค้าปลีก (ภาพที่ 2.3) เช่น มีด เขียงไม้ เครื่องบดเนื้อ และบริเวณแสดงสินค้าสำหรับวางจำหน่าย (counter) รวมไปถึง บริเวณผนังและพื้นของร้านในเมืองการาจี ประเทศปากีสถาน (Karachi, Pakistan) ทั้งหมด 340 ตัวอย่าง โดยตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญถึงร้อยละ 66 ได้แก่ เชื้อ *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *Listeria*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus Salmonella* Enteritidis, *Shigella*, *Brucella*, *Citrobacter freundii*, *Kurthia* และ *Sporosarcina* ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ตรวจพบจากเนื้อสัตว์ที่พบในจุดวางจำหน่ายมากที่สุดได้แก่ เชื้อ *E. coli* โดยตรวจพบถึงร้อยละ 35 รองลงมาได้แก่ เชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Enterobacter* ที่ตรวจพบทั้งหมดร้อยละ 15 และในส่วนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างจากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมบริเวณร้านค้าปลีกมากที่สุดได้แก่ เชื้อ *E. coli* เช่นเดียวกันกับที่ตรวจพบในเนื้อสัตว์ โดยตรวจพบถึงร้อยละ 24 การพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสัตว์รวมทั้งเชื้อ *E. coli* มีสาเหตุหลักมาจากการจัดการซากสัตว์ในขั้นตอนก่อนนำมาตัดแต่งเพื่อมาจัดหน่ายปลีกให้กับผู้บริโภคไม่ได้สุขอนามัย มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบริเวณพื้นผิวของตัวซากที่นำมาตัดแต่ง และในส่วนของการพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมบริเวณร้านค้าปลีก ตรวจพบทั้งบริเวณที่สัมผัสกับเนื้อสัตว์โดยตรง ทั้งบริเวณแสดงสินค้าสำหรับวางจำหน่าย รวมไปถึงผนังและพื้น อย่างไรก็ตาม พบว่าบริเวณแสดงสินค้าสำหรับวางจำหน่าย มีการปนเปื้อนของเชื้อค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น เนื่องจากเป็นพื้นที่วางสินค้าสินค้า ทำให้มีการทำความสะอาดบ่อยครั้งในแต่ละวัน และการพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมบริเวณร้านค้าปลีกเป็นจำนวนมากนั้น แสดงให้เห็นว่ามีการทำความสะอาดพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้เป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ และมีโอกาสปนเปื้อนไปยังเนื้อสัตว์ที่วางจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

ภาพที่ 2.3 ร้านค้าปลีกจำหน่ายเนื้อสัตว์ในเมืองการาจี ประเทศปากีสถาน

ที่มา : Aamir (2013)

2.3 การควบคุมและยับยั้งเชื้อ *E. coli*

ในการควบคุมและยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีปัจจัยสำคัญ ดังนี้

อุณหภูมิ (temperature) : เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15 – 45°C โดยมีภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตมากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 40°C (Garrity, 2005) อย่างไรก็ตาม การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C ขึ้นไป พบว่าสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* ได้อย่างรวดเร็ว ทั้งเชื้อ *E. coli* ทั่วไปและสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยได้มีการกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อ *E. coli* O157:H7 ดังนี้ องค์การอนามัยโลก (World health organization) แนะนำให้ปรุงอาหารด้วยการให้ความร้อนอย่างทั่วถึง เพื่อให้อาหารมีอุณหภูมิไม่น้อยกว่า 70°C (WHO, 2018) ในประเทศไอร์แลนด์กำหนดให้ใช้อุณหภูมิ 70°C เป็นระยะเวลา 2 นาทีหรือใช้อุณหภูมิ 75°C เป็นระยะเวลา 18 วินาที (Food Safety Authority of Ireland, 2018) สำหรับการปรุงอาหารประเภทแฮมเบอเกอร์จากเนื้อโค และ the advisory committee on the microbiological safety of food (ACMSF, 1995) ได้ให้คำแนะนำการให้ความร้อนในการปรุงอาหารประเภทเนื้อโคบด ตามที่ระบุในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การให้ความร้อนในการปรุงอาหารประเภทเนื้อวัวบดเพื่อทำลายเชื้อ *E. coli* O157:H7 ตามคำแนะนำของ ACMSF

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลาที่ให้ความร้อน
60	45 นาที
65	10 นาที
70	2 นาที
75	30 วินาที
80	6 วินาที

ที่มา : Stringer และคณะ (2000)

โดยค่า decimal reduction time (D value) ของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ STEC serotype อื่นๆ ในเนื้อสุกร เนื้อโคและเนื้อสัตว์ชนิดอื่น มีค่าตามที่ระบุดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ค่า D value สำหรับการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ STEC serotype อื่นๆ ในเนื้อสุกร เนื้อโค และเนื้อสัตว์ชนิดอื่นเนื้อสัตว์ชนิดอื่น

อุณหภูมิ (°C)	D value (นาที)	
	เนื้อสุกร / เนื้อวัว	เนื้อสัตว์ชนิดอื่น
55	33.6	36.3
56	23.9	26.0
57	17.0	18.7
58	12.1	13.4
60	8.6	9.6
60	6.1	6.9
61	4.4	5.0
62	3.1	3.6
63	2.2	2.6
64	1.6	1.9
65	1.1	1.3
66	0.8	1.0
67	0.6	0.7
68	0.4	0.5
69	0.3	0.4
70	0.2	0.3

ที่มา : Ministry for primary industry New Zealand (2015)

การใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อพื้นผิวที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เช่น การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้สัมผัสอาหาร เช่น จาน ช้อน ในร้านอาหารโดยทั่วไป อุณหภูมิของน้ำร้อนที่ใช้ฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต้องไม่น้อยกว่า 180°F หรือ 82°C และต้องมีระยะสัมผัสไม่ต่ำกว่า 30 วินาที (Fraser, 2003) หากใช้น้ำร้อนในการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของตัวซากสัตว์หลังผ่านการเชือดและผ่าขึ้นซากในโรงเชือดสัตว์ อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ต้องไม่น้อยกว่า 180°F หรือ 82°C เช่นเดียวกัน และหากใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำต้องใช้ความร้อนของไอน้ำในระดับพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) จึงสามารถฆ่าเชื้อได้ระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 30 วินาที ซึ่งเรียกการฆ่าเชื้อในรูปแบบนี้ว่า steam pasteurization จากคำแนะนำของ Food safety and inspection service (2002) พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำสามารถแทรกแซงเข้าไป

บริเวณพื้นผิวของตัวซากและลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนเนื้อเยื่อผิวของซากโคที่ผ่านการเชือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 3.5 log cfu/ตารางเมตร จากการใส่เชื้อ *E. coli* O157:H7 (inoculation) เริ่มต้นที่ 5.0 log cfu/m^2 (โดยที่การลดลงของเชื้อ 1 log คือการลดลงของเชื้อ 10 เท่า) ที่บริเวณพื้นผิวของซากโค และการฆ่าเชื้อสามารถมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น หากใช้ร่วมกับการลดเชื้อด้วยวิธีอื่น เช่น การฉีดล้างซาก (washing) พบว่า สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้น โดยลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 4.22 ± 0.53 log cfu/ตารางเมตร

ความเป็นกรดด่าง (pH) : เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 5.0 – 9.0 (Garrity, 2005) ในส่วนของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยการปรับค่า pH นั้น ขึ้นอยู่กับสารเพิ่มความเป็นกรดที่ใช้เติมในอาหารและอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ดังตัวอย่างเช่น หากเติมกรดอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์มายองเนสจนมีค่า pH 3.65 จะสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 7 log ที่อุณหภูมิ 25°C (โดยที่การลดลงของเชื้อ 1 log คือการลดลงของเชื้อ 10 เท่า) ลดลง และที่มีค่า pH น้อยกว่า 3 พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ก่อโรคได้ (Smittle, 2000)

วอเตอร์แอคทีวิตี้ (water activity) : ค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ 0.99 (สุวิมล, 2559) โดยค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ที่ต่ำที่สุด (minimum water activity) ที่เชื้อ *E. coli* ก่อโรค (STEC) สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้คือ 0.95 ซึ่งปริมาณตัวถูกละลาย เช่น เกลือ เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ของสารละลาย โดยค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ จะแปรผกผันกับปริมาณตัวถูกละลายหรือความเข้มข้นของสารละลาย โดยที่ปริมาณของเกลือ (sodium chloride) ที่ร้อยละ 2.5 พบว่าเชื้อ *E. coli* ก่อโรค (STEC) จะมีการเจริญที่ลดลง และที่ปริมาณของเกลือร้อยละ 8.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ก่อโรค (STEC) ได้ (Lawley, 2013)

สารถนอมอาหาร (Preservatives) : การใช้สารถนอมอาหารประเภทเกลือ (sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 8.5 ที่อุณหภูมิ 37 °C สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจะลดลงเมื่ออุณหภูมิและค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงไป ในส่วนของสารถนอมอาหารอื่นๆ เช่น การเติมเกลือ sodium benzoate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถลดการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้อย่างรวดเร็วในผลิตภัณฑ์น้ำแอปเปิ้ลและพบว่า

หากมีการเติมเกลือ potassium sorbate ร้อยละ 0.1 ทดแทนการเติมเกลือ sodium benzoate ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้ (Ministry for primary industry New Zealand, 2001)

สารฆ่าเชื้อ (Disinfectant) : สารฆ่าเชื้อมีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลายในบริเวณพื้นผิวต่าง ๆ ของสิ่งที่ไม่มีชีวิต ทั้งแบคทีเรียโดยทั่วไป เชื้อรา สปอร์ และไวรัส เป็นต้น โดยทั่วไปสารฆ่าเชื้อที่มักใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ คลอรีน (Chlorine), ไอโอโดฟอร์ (Iodophor), สารประกอบควอเทอนารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium compound, QUAT) และ กรด (Acid) (Marriott, 1997) โดยสารฆ่าเชื้อแต่ละตัวมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ รวมทั้งเชื้อ *E. coli* ดังนี้

1) คลอรีน (Chlorine) มีกลไลการออกฤทธิ์โดยการออกซิไดซ์ (oxidise) หมู่ thiol (-SH group) ให้กลายเป็น S-S group ทำให้โปรตีนถูกทำลายและตกตะกอน สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ เชื้อรา ไวรัส และสปอร์ได้ และสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้รุนแรง ทำให้เกิดโปรตีนเสียสภาพ (denature) แต่เนื่องจากคลอรีนเป็นก๊าซพิษ จึงนิยมใช้ในรูปของเกลือ โดยเกลือไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite (ClO^-)) และ คลอรามีน (chloramine (NH_2Cl)) จะเปลี่ยนเป็นกรดไฮโปคลอริค (hypochloric acid) ในน้ำแล้วสลายตัวให้คลอรีน (วรรณพร, 2559) โดยข้อดีของ Chlorine คือ เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี ราคาถูก แต่มีข้อเสีย คือ มีฤทธิ์กัดกร่อนสูง สามารถกัดกร่อนโลหะ (Marriott, 1997) โดยความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้อยู่ที่ 50 ppm ด้วยการผสมน้ำที่อุณหภูมิ 24 – 37^{o}C มีระยะเวลาสัมผัสไม่น้อยกว่า 7 วินาที (Fraser, 2003)

2) ไอโอโดฟอร์ (Iodophor) มีกลไลการออกฤทธิ์โดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา และไวรัส โดยไอโอโดฟอร์จะปลดปล่อยไอโอดีนอิสระ (free iodine) ออกสู่สารละลายช้า ๆ สามารถฆ่าเซลล์ได้ทั้งโพรแคริโอต (prokaryote) และยูแคริโอต (eukaryote) โดยการเกิดปฏิกิริยาไอโอดิเนชัน (iodination) กับลิปิด (lipid) สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารประกอบในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และบนเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น ประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับปริมาณไอโอดีนอิสระ ที่ปล่อยออกมา นอกจากนั้น ยังสามารถรบกวนกระบวนการการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport) โดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในระบบการหายใจระดับเซลล์ (วรรณพร, 2559) โดยข้อดีของ Iodophor คือ เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี โดยมีความเสถียรมากกว่า chorine (Marriott, 1997) แต่มีข้อเสีย คือ มีฤทธิ์กัดกร่อน และทิ้งคราบบนพื้นผิว (วรรณพร, 2559) โดยความเข้มข้นที่แนะนำให้

ใช้อยู่ที่ 12.5 - 25 ppm ด้วยการผสมน้ำที่อุณหภูมิ 24°C มีระยะเวลาสัมผัสไม่น้อยกว่า 30 วินาที โดยไอโอโดฟอร์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสภาวะกรดที่ pH 3 และไม่แนะนำให้ใช้งานที่อุณหภูมิเกิน 49°C หากเกินกว่านั้นไอโอโดฟอร์สามารถสลายตัวได้ (Fraser, 2003)

3) สารประกอบควอเทอนารีแอมโมเนียม(Quaternary ammonium compound, QUAT) เป็นสารลดแรงตึงผิวประจุบวก (cationic surfactant) ประเภทหนึ่ง สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยออกฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย รวมถึงเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ (วรรณพร, 2559) โดยข้อดีของ QUAT คือ ไม่เป็นพิษ ไม่กัดกร่อนพื้นผิว เหมาะกับการใช้ฆ่าเชื้อบริเวณพื้น ผนัง และ อุปกรณ์ในโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ เนื่องจาก QUAT สามารถสร้างฟิล์ม (film) เคลือบพื้นผิวที่ถูกฆ่าเชื้อด้วย QUAT ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (Marriott, 1997) แต่มีข้อเสีย คือ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ในระดับต่ำและจึงต้องใช้ในความเข้มข้นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่น ไม่สามารถฆ่าเชื้อไวรัสได้ (วรรณพร, 2559) โดยความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้อยู่ที่ 200 ppm ด้วยการผสมน้ำที่อุณหภูมิ 24°C มีระยะเวลาสัมผัสไม่น้อยกว่า 30 วินาที (Fraser, 2003)

4) กรด (Acid) มีกลไลการออกฤทธิ์โดยการทำให้โปรตีนและลิปิดเสียสภาพ โดยรบกวนโครงสร้างของโปรตีนและไขมัน รวมไปถึงทำให้ปฏิกิริยาในเซลล์เสียสมดุลโดยรบกวนสมดุลของไฮโดรเจน (H^+) (วรรณพร, 2559) โดยข้อดีของกรดคือ เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ของจุลินทรีย์ (vegetative cell) ได้เป็นอย่างดี และคงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง (ไม่เกิน 100°C) (Marriott, 1997) แต่มีข้อเสีย คือ มีราคาค่อนข้างแพง รวมไปถึงมีฤทธิ์กัดกร่อน ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้งานกับพื้นผิวบางชนิด โดยความเข้มข้นที่แนะนำให้ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรด ยกตัวอย่างเช่น หากเป็นกรดแร่ (mineral acid) เช่น กรดเกลือ (HCl) และกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 M (pH น้อยกว่า 3) เป็นต้น

การใช้กรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนในการฆ่าเชื้อ พบว่ามีกลไกในการแพร่ผ่านและรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้สามารถลดจำนวนของเชื้อได้ โดยกรดอ่อนที่ใช้ในโรงเชือดสัตว์ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) , กรดซิตริก (citric acid) และกรดแลคติก (lactic acid) (Food safety and inspection service, 2002) โดยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บริเวณพื้นผิวของซากโคได้ 2 log cfu/ตารางเมตร ในส่วนของกรดซิตริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บริเวณพื้นผิวของซากโคได้ 1.88 log cfu/ตารางเมตร และกรดแลคติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli*

O157:H7 บริเวณพื้นผิวของซากโคได้ 2.66 log cfu/ตารางเมตร (Food safety and inspection service, 2002)

มีงานวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่มีผลต่อเชื้อ *E. coli* โดยมีสารฆ่าเชื้อทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ โอโซน (ozone), คลอรีน (chlorine), คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) และคลอรามีน (chloramines) ที่อุณหภูมิ 5°C เพื่อลดจำนวนของเชื้อ *E. coli* ให้ลดลงร้อยละ 99 (Block, 1991) ให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลการใช้สารฆ่าเชื้อ 4 ชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 5 °C ให้ลดลงร้อยละ 99

ค่าความเข้มข้นและระยะเวลา (C-t) ของสารฆ่าเชื้อ (mg-min/L)			
Free chlorine	Preformed chloramine	Chlorine dioxide	Ozone
pH 6-7	pH 3-9	pH 6-7	pH 6-7
0.034 – 0.05	95 - 180	0.4 – 0.75	0.02

ที่มา : Block (1991)

จากตารางที่ 2.5 พบว่าการใช้โอโซนเพื่อฆ่าเชื้อ *E. coli* จะใช้ปริมาณของสารและระยะเวลาในการฆ่าเชื้อต่ำที่สุด (C-t) รองลงมาได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ และคลอรีนอิสระสำหรับสารที่ปริมาณของสารและระยะเวลาในการฆ่าเชื้อสูงที่สุด (C-t) ได้แก่ คลอรามีน จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าโอโซนประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดจำนวนของเชื้อ *E. coli*

นอกจากนี้ ในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* มากกว่า 1 ชนิด ร่วมกันเพื่อเสริมประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อให้ดียิ่งขึ้น เช่น การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไปพร้อมกับการใช้สารฆ่าเชื้อ เป็นต้น พบว่า หากใช้อุณหภูมิของน้ำ 55°C ผสมกับกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บริเวณพื้นผิวของซากโคได้ถึง 3.0 – 4.9 log cfu/ตารางเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดแลคติกในการฆ่าเชื้อเพียงวิธีเดียว พบว่า ถึงแม้จะใช้กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับความร้อน สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บริเวณพื้นผิวของซากโคได้ 2.66 log cfu/ตารางเมตร ซึ่งมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับความร้อน (Food safety and inspection service, 2002) รวมไปถึง

งานวิจัยของ Singh และคณะ (2017) พบว่าการฆ่าเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวซากไก่ โดยการจุ่มซากไก่ลงในสารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟต (Trisodium phosphate) ความเข้มข้นร้อยละ 8 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 45 วินาที จากนั้นนำซากไก่ไปลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 71°C เป็นระยะเวลา 45 วินาที สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวซากไก่ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มซากไก่ลงในสารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟต หรือการนำซากไก่ไปลวกในน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว

2.4 เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

อาหารแช่เยือกแข็งมีบทบาทมากกับชีวิตประจำวันของมนุษย์ที่มีการเร่งรีบมากขึ้น ทำให้อาหารแช่เยือกแข็งถูกพัฒนาในรูปแบบใหม่ๆ เพื่อลดเวลาในการเตรียมและสะดวกในการบริโภค อาหารแช่เยือกแข็งเป็นอาหารที่ผ่านกรรมวิธีแปรรูปเพื่อถนอมอาหาร โดยการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าอุณหภูมิ - 18°C โดยน้ำในอาหารถูกเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง เป็นการถนอมอาหารที่รักษาความสดและคุณภาพอาหารได้ดีกว่าวิธีอื่น เช่น การแช่อิ่ม หรือ การตากแห้ง ผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งในปัจจุบันมีหลายประเภท เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์แช่แข็ง หรืออาหารที่ผ่านการปรุงสุกแช่แข็ง (ready-to-eat food) เป็นอาหารพร้อมรับประทานหรือนำไปอุ่นก็สามารถรับประทานได้ทันที รวมไปถึง อาหารพร้อมปรุงแช่เยือกแข็ง (ready-to-cook food) เป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมาในระดับหนึ่งและไม่ถูกนำไปให้ความร้อนก่อนทำการแช่แข็ง (สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย, 2558)

เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง เช่น เนื้อสุกรปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็ง (frozen steamed-breaded meat) เป็นอาหารพร้อมปรุงแช่เยือกแข็งที่ถูกจำหน่ายไปยังร้านอาหาร หรือร้านสะดวกซื้อต่างๆ เพื่อนำไปปรุงต่อเป็นอาหารได้หลายรูปแบบ เช่น นำไปทอดเป็นเนื้อสุกรชุบเกล็ดขนมปังทอด (deep-fried pork cutlet) ดังภาพที่ 2.3ก นำไปประกอบอาหารทานเล่น เช่น แซนวิช ดังภาพที่ 2.3ข หรือนำไปปรุงพร้อมหอมหัวใหญ่และไข่ ดังภาพที่ 2.3ค จากนั้นรับประทานพร้อมข้าว หรือ รับประทานคู่กับแกงกะหรี่ ดังภาพที่ 2.3ง อาหารประเภทนี้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น (Itoh, 2011)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

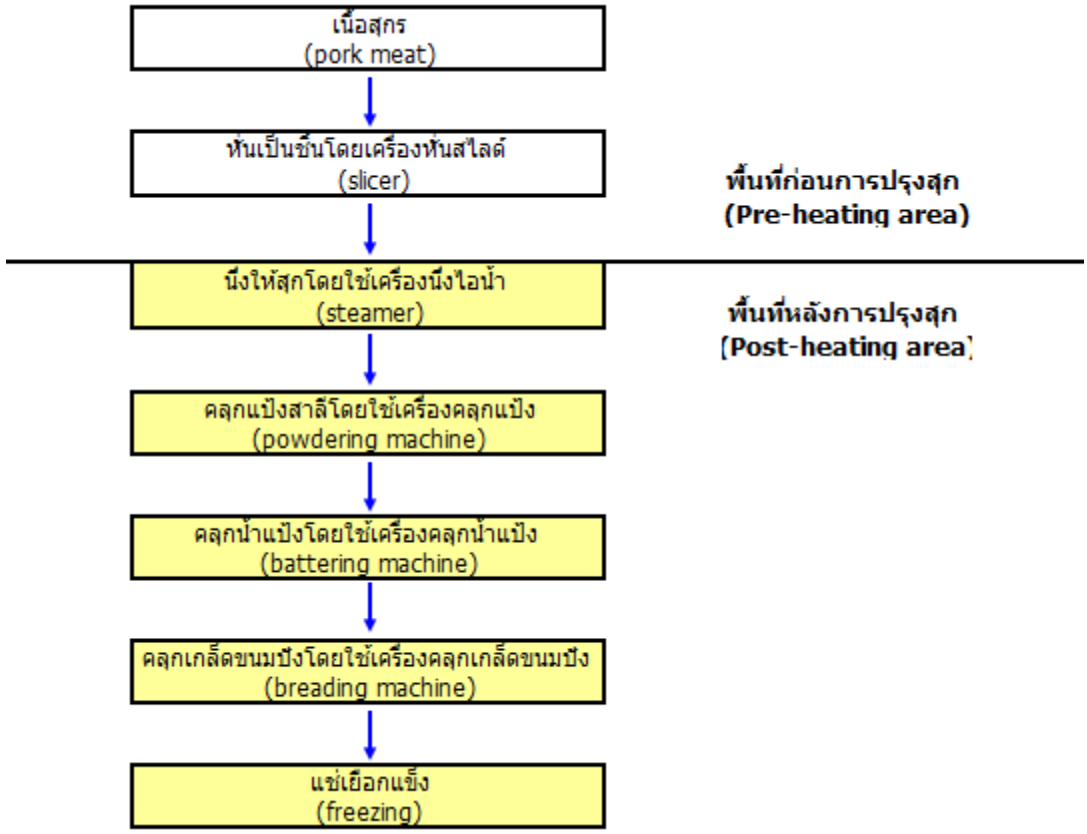
ภาพที่ 2.4 อาหารที่ถูกปรุงจากเนื้อสุกรปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปัง เนื้อหมูชุบเกล็ดขนมปังทอด หรือ tonkatsu (ก) แซนวิชจากเนื้อหมูชุบเกล็ดขนมปังทอด (ข) ข้าวหน้าหมูทอดตุ๋น หรือ katsudon (ค) ข้าวราดแกงกะหรี่หมู (ง)

ที่มา : Japan experience (2017)

2.4.1 กระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

ในการผลิตอาหารพร้อมปรุงประเภทเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง เช่น เนื้อสุกรปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็ง (frozen steamed-breaded meat) มีกระบวนการผลิตโดยการนำเนื้อสุกรในส่วนสันนอก (loin pork meat) หรือ ในส่วนสันใน (tenderloin pork meat) มาหั่นให้เป็นชิ้นโดยใช้เครื่องหั่นสไลด์ (slicer) ในในบริเวณพื้นที่ก่อนการปรุงสุก (pre-heating area) นำมาผ่านความร้อนโดยใช้เครื่องนึ่งไอน้ำ (steamer) เพื่อให้ชิ้นเนื้อสุก จากนั้นชิ้นเนื้อจากถูกลำเลียงไปในพื้นที่หลังการปรุงสุก (post-heating area) เพื่อคลุกแป้งสาลีโดยใช้เครื่องคลุกแป้ง (powder machine) คลุกน้ำแป้งเหลว (batter) โดยใช้เครื่องคลุกน้ำแป้ง (battering machine) และคลุกเกล็ดขนมปังโดยใช้เครื่องคลุกเกล็ดขนมปัง (breading machine) แล้วนำไปแช่เยือกแข็งโดยใช้เครื่องแช่เยือกแข็ง

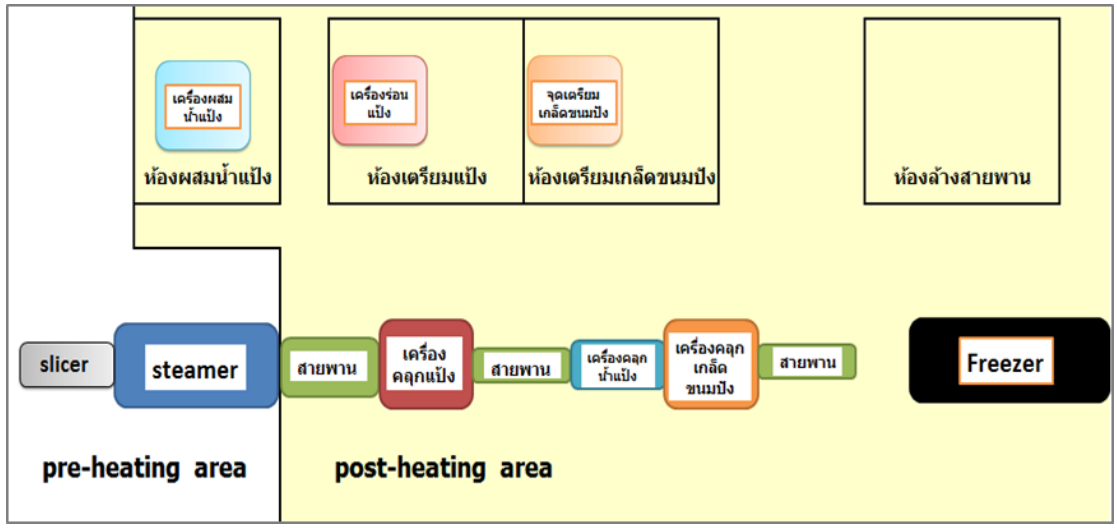
(freezer) บรรจุในบรรจุภัณฑ์และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า – 18°C เพื่อรอส่งมอบให้กับลูกค้า ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 แผนผังพื้นที่การผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งแห่งหนึ่ง

แป้งสาลีและวัตถุดิบอื่นๆ ถูกเตรียมโดยใช้เครื่องร่อนแป้งในบริเวณห้องร่อนแป้ง ในส่วนของน้ำแป้งเหลวถูกเตรียมโดยใช้เครื่องผสมน้ำแป้ง (mixer) ในบริเวณห้องผสมน้ำแป้ง และเกล็ดขนมปังจะถูกเตรียมในบริเวณห้องเตรียมเกล็ดขนมปัง เนื้อสุกรที่ผ่านการปรุงสุกเครื่องนึ่งไอน้ำถูกนำมาคลุกวัตถุดิบอีกหลายชนิดก่อนนำไปแช่เยือกแข็งในพื้นที่หลังการปรุงสุกดังภาพที่ 2.5 ซึ่งการพบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มักเกิดขึ้นที่ขั้นตอนหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว ในพื้นที่หลังการปรุงสุก (post-heating area) เนื่องจากเนื้อสุกรที่ผ่านการปรุงสุกถูกนำมาคลุกวัตถุดิบอีกหลายชนิดก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการคลุกวัตถุดิบแต่ละชนิด มีการใช้อุปกรณ์และเครื่องจักรเป็นจำนวนมาก ดังภาพที่

2.6 ทำให้มีโอกาสที่จะปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* จากพนักงาน อุปกรณ์ เครื่องจักร และสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่นำมาใช้



ภาพที่ 2.6 แผนผังพื้นที่การผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งแห่งหนึ่ง

2.4.2 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออก

มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง ได้ถูกกำหนดในเกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์ของประเทศไทย ซึ่งระบุว่าต้องไม่พบเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ (กรมปศุสัตว์, 2551) รวมไปถึงข้อกำหนดด้านจุลินทรีย์สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งสำหรับส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นด้วย (Specifications and standards for foods, food additives etc. under the food sanitation act (abstract), 2010) ดังตารางที่ 2.6 แสดงให้เห็นว่า มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวกับเชื้อ *E. coli* มีความเข้มงวดเป็นอย่างมาก ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารจำเป็นต้องมีวิธีการให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสม รวมไปถึงต้องมีการควบคุมไม่ให้ผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ภายหลังการให้ความร้อน และต้องมีวิธีการดูแลทำความสะอาดเครื่องจักร อุปกรณ์ และสิ่งแวดล้อมในการผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ รวมไปถึงควรมีการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึง เชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต เพื่อทวนสอบประสิทธิภาพการทำความสะอาดตามวิธีที่กำหนดอย่างสม่ำเสมออีกด้วย ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้มีการกำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ดังตารางที่ 2.7 เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสำหรับอาหารวัตถุดิบ และภาชนะสำหรับผู้ประกอบการด้านอาหาร โดยทางผู้ผลิตได้นำเกณฑ์นี้เป็นแนวทางใน

การกำหนดเกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต เพื่อควบคุมคุณภาพภายในโรงงาน ดังตารางที่ 2.8 โดยแบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ออกเป็น 3 โซน (zone) ได้แก่ โซนที่ 1 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง ถัดมาเป็นโซนที่ 2 เป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง แต่อยู่ใกล้ผลิตภัณฑ์และพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยาก และโซนที่ 3 เป็นโซนที่มีความเสียงต่ำสุด ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 2.6 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของกรมปศุสัตว์และประเทศญี่ปุ่น สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออก

	ข้อกำหนดเพื่อการส่งออก		
	กรมปศุสัตว์		ประเทศญี่ปุ่น
เชื้อจุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงสุก (heat-treated meat products)	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปัง (cooked meat with non-heat coating)	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงสุก (heated meat products) *
Total plate count	$\leq 1.0*10^5$ cfu/g	$\leq 1.0*10^5$ cfu/g	ไม่ระบุ
Coliform	≤ 100 org/g	≤ 500 org/g	ไม่ระบุ
Escherichia coli	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
Clostridium perfringens	ต้องไม่พบ	**	ไม่ระบุ
Staphylococcus aureus	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
Enterococci sp.	≤ 100 cfu/g	≤ 100 cfu/g	ไม่ระบุ
Salmonella spp.	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
Listeria monocytogenes	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ไม่ระบุ
Yeasts & mold	≤ 100 cfu/g	**	ไม่ระบุ

* packed in package after being heat-sterilized

** คือ ไม่มีเกณฑ์ / มาตรฐาน กำหนดแต่กรมปศุสัตว์จะทำการเฝ้าระวัง และโรงงานควรมีการสุ่มตรวจเป็นระยะ

ที่มา : กรมปศุสัตว์ (2551) และ Specifications and standards for foods, food additives etc. under the food sanitation act (abstract) (2010)

ตารางที่ 2.7 ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ประเภทพื้นผิวสัมผัสอาหาร

เชื้อจุลินทรีย์	เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา
Total plate count	น้อยกว่า 100 cfu/ตารางเซนติเมตร
Escherichia coli	ไม่พบ/ 50 ตารางเซนติเมตร
Staphylococcus aureus	ไม่พบ/ 50 ตารางเซนติเมตร
Salmonella spp.	ไม่พบ/ 50 ตารางเซนติเมตร
Clostridium perfringens	ไม่พบ/ 50 ตารางเซนติเมตร
Bacillus cereus	ไม่พบ/ 50 ตารางเซนติเมตร

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2560)

ตารางที่ 2.8 เกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเพื่อควบคุมคุณภาพภายในโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออก

Zone	เชื้อจุลินทรีย์	เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยา
1	Total plate count	น้อยกว่า 100 cfu/ 100 ตารางเซนติเมตร
2	Total plate count	น้อยกว่า 500 cfu/ 100 ตารางเซนติเมตร
3	Total plate count	น้อยกว่า 500 cfu/ 100 ตารางเซนติเมตร
1,2 และ 3	*Escherichia coli*	ไม่พบ/ 100 ตารางเซนติเมตร
1,2 และ 3	Coliforms	ไม่พบ/ 100 ตารางเซนติเมตร

หมายเหตุ : โซนที่ 1 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง โซนที่ 2 เป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง แต่อยู่ใกล้ผลิตภัณฑ์และพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยาก และโซนที่ 3 เป็นโซนที่มีความเสียงต่ำสุด ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์

ที่มา : โรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออกแห่งหนึ่ง

2.5 การประยุกต์ใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (molecular method) เพื่อค้นหาแหล่งการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli*

การติดตามแหล่งการปนเปื้อนของแบคทีเรีย (bacteria source tracking : BST) เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกแหล่งของเชื้อจุลินทรย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมาจากอุจจาระในตัวอย่างน้ำที่ได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งการทำ BST สามารถเลือกใช้ความแตกต่างทางคุณลักษณะ หรือ ความจำเพาะที่

เปรียบเสมือนรอยนิ้วมือ (fingerprint) เช่น การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ หรือ สารพันธุกรรม (DNA) สามารถนำมาใช้แต่การจำแนกแบคทีเรียในระดับสายพันธ์ได้ ซึ่งการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (molecular method) เป็นวิธีทาง BST ที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย มักอ้างอิงถึงการใช้ DNA finger printing ที่อาศัยความจำเพาะทางพันธุกรรม ซึ่งในแต่ละวิธีของ molecular method จะใช้ความแตกต่างของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เปรียบเสมือนกับการใช้ความจำเพาะของลายนิ้วมือของแต่ละบุคคล ในการจำแนกแหล่งของการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (Environmental protection agency : EPA), 2002)

การตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในกระบวนการผลิตอาหาร ทั้งในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสิ่งแวดล้อมภายในโรงงาน มักเป็นการตรวจเชื้อ *E. coli* แบบพบ/ไม่พบ หรือใช้การตรวจที่สามารถนับจำนวนของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนได้ เช่น 3M Petrifilm™ *E. coli* /Coliform Count Plates ซึ่งการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับสปีชีส์ (species) เท่านั้น ข้อมูลที่ได้ไม่ละเอียดเพียงพอต่อการเชื่อมโยงการแพร่กระจายของเชื้อหรือการค้นหาแหล่งกำเนิดการแพร่ระบาดของเชื้อในโรงงาน การใช้เทคนิคที่สามารถบ่งชี้ถึงระดับสายพันธุ์ (subtyping) ของเชื้อ *E. coli* จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดเพียงพอต่อการเชื่อมโยงการแพร่กระจายของเชื้อและที่มาของการระบาด โดยวิธีการทำ DNA finger printing หลายวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการทำ subtyping เช่น pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Multi-locus sequence typing (MLST), phylogenetic group หรือ multiple- locus variable number tandem repeat (MLVA), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) เป็นต้น

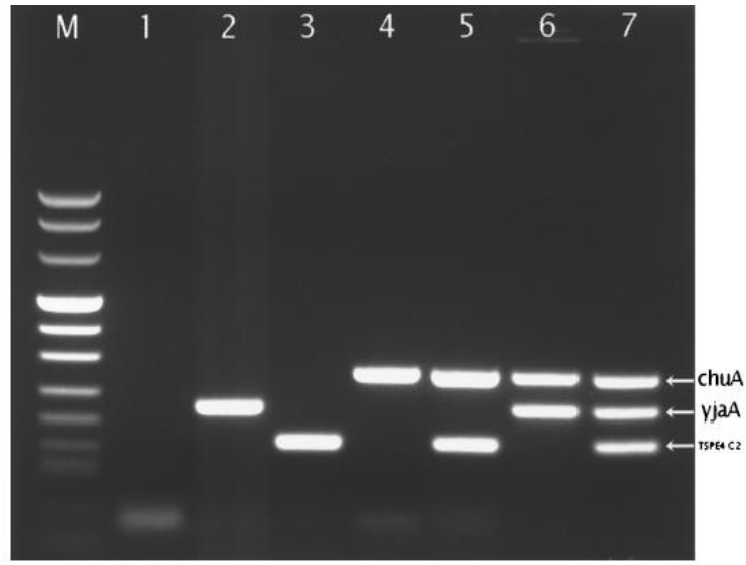
Keeratipibul และ Techaruwichit (2012) ใช้เทคนิค PCR- RAPD- based DNA fingerprinting จำแนกและสอบย้อนกลับการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* ในโรงงานผลิตไก่ปรุงสุก โดยเก็บตัวอย่างสินค้าปรุงสุก สินค้าที่อยู่ในระหว่างกระบวนการ และสวอปสิ่งแวดล้อมต่างๆ เพื่อกำจัดแหล่งปนเปื้อนที่ส่งผลกระทบต่อสินค้า พบว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความชุกในการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria spp*. ในสินค้าปรุงสุกร้อยละ 1.6 ไม่พบการปนเปื้อนในสินค้าระหว่างกระบวนการ ในส่วนของการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria spp*. ในสิ่งแวดล้อมบริเวณพื้นที่การผลิต พบว่ามีการปนเปื้อนของ *Listeria spp*. เป็นจำนวนมากในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมทั้งโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยเป็นเชื้อ *L. innocua* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 82.3 ของตัวอย่างที่พบเชื้อ *Listeria spp*. รองลงมาเป็นเชื้อ *L. welshimeri* , *L. seeligeri* และ *L. monocytogene* คิดเป็นร้อยละ 11.2, 5.5 และ 0.1 ตามลำดับ ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตด้วยวิธี RAPD สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อ *L. innocua* ได้ทั้งหมด 3 สายพันธุ์หลัก

จากการตรวจสอบพบว่าเชื้อ *L. innocua* ที่ปนเปื้อนในสินค้าเกิดจากการปนเปื้อนข้ามจากท่อระบายแก๊สของเครื่องแช่เย็นระบบไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen chiller) เป็นหลัก เนื่องจากมีหยดน้ำควบแน่นจากท่อระบายแก๊สหยดลงบนสายพานของเครื่องแช่เย็นระบบไนโตรเจนเหลวแล้วนำพาเชื้อปนเปื้อนไปสู่สินค้าในที่สุด ซึ่งการจัดการการบวนการผลิตหลังการประเมินความเสี่ยงแหล่งการปนเปื้อนของ *Listeria* โดยใช้เทคนิค RAPD ทำให้ความชุกของ *Listeria* ที่พบในสินค้าลดลงจากร้อยละ 1.6 เหลือเพียงร้อยละ 0.2

มีรายงานของ Honish และคณะ (2017) พบการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ครั้งใหญ่ในเมืองอัลเบอร์ตา ประเทศแคนาดา (Alberta, Canada) ในปี ค.ศ. 2014 โดยร้ายแรงเป็นอันดับ 3 ในประวัติศาสตร์ของการระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ทั้งหมดในประเทศแคนาดา พบผู้ป่วยทั้งหมด 119 รายจากการรับประทานเนื้อหมูที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 แต่ไม่มีรายงานผู้เสียชีวิต โดยในผู้ป่วย 119 คน พบว่า 4 ราย (ร้อยละ 3) ไม่ได้รับเชื้อจากการรับประทานเนื้อสุกรที่มีการปนเปื้อนโดยตรง แต่ได้รับเชื้อจากการสัมผัสผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากการรับประทานเนื้อสุกรที่ปนเปื้อน (secondary infection) เข้าไป โดยเมื่อเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ ตัวอย่างเนื้อสุกรจากร้านอาหาร ตัวอย่างสวอปจากพื้นผิวที่เตรียมอาหาร รวมไปถึง ตัวอย่างพื้นผิวสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิตเนื้อสุกรในโรงเชือดสุกร เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่า เชื้อ *E. coli* O157:H7 จากผู้ป่วยจำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วย Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) มีความสัมพันธ์กันกับตัวอย่างที่ตรวจพบจากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิตเนื้อสุกรในโรงเชือดสุกร และจากการวิเคราะห์สาเหตุการปนเปื้อนโดยหน่วยงานกำกับดูแลด้านอาหารพบว่า โรงเชือดสุกรมีการเชือดสัตว์หลายชนิด ได้แก่ สุกร โค และกระบือ โดยจากการสังเกต พบว่า มีโอกาสในการปนเปื้อนข้ามของเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากการใช้อุปกรณ์ในการเชือดสัตว์ในแต่ละชนิดร่วมกัน เช่น ใบมีด ซึ่งได้รับการทำความสะอาดไม่เพียงพอ พบปัญหาด้านสุขอนามัยของผู้ปฏิบัติงานที่ไม่ได้รับการดูแลเอาใจใส่ รวมไปถึงผู้ปฏิบัติงานขาดความรู้ด้านความปลอดภัยอาหาร จึงมีการปิดโรงเชือดสัตว์ดังกล่าวชั่วคราว เพื่อดำเนินการปรับปรุง

Yang และคณะ (2017) ได้ใช้เทคนิค MLVA เพื่อ mapping แหล่งการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในเนื้อวัวตัดแต่งในโรงงานบรรจุเนื้อวัว โดยเก็บตัวอย่างจาก facilities ต่างๆ เช่น โต๊ะ เก้าอี้ มีด ถุงมือ และสายพานลำเลียง เป็นต้น พบว่าแหล่งการปนเปื้อนในเนื้อวัวไม่ได้มาจากอุปกรณ์ในห้องพักพนักงาน (โต๊ะ, เก้าอี้ และที่ใส่กระดาษทิชชู่) แต่มาจากสายพานลำเลียง, โต๊ะตัดแต่ง และถุงมือตาข่ายอย่างมีนัยสำคัญ

การจำแนกเชื้อ *E. coli* แบบ phylogenetic group หรือ phylotyping นั้นเป็นวิธีการจำแนกในเบื้องต้นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก วิธีนี้สามารถแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ออกเป็น 4 phylogroups ใหญ่ๆ ได้แก่ A, B1, B2 และ D (Clermont et al., 2000) โดยใช้วิธี Triplex polymerase chain reaction ซึ่งใช้ยีน (gene) 2 ชนิด ได้แก่ *chuA* และ *yjaA* และใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (DNA fragment) ที่เรียกว่า TSPE4.C2 โดยยีน *chuA* จะปรากฏเฉพาะสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D ดังนั้นสามารถใช้ยีน *chuA* แยกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D ออกจากเชื้อ *E. coli* phylogroup A และ B1 ได้ ในส่วนของยีน *yjaA* สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D ออกจากกัน เนื่องจากยีน *yjaA* จะปรากฏในเชื้อ *E. coli* phylogroup B2 เท่านั้น สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* phylogroup A และ B1 จะใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 โดยจะปรากฏชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 ในเชื้อ *E. coli* phylogroup B1 และไม่ปรากฏชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 ในเชื้อ *E. coli* phylogroup A ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ *E. coli* โดยวิธีการ phylogenetic group (ช่องที่ 1 และ 2 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup A, ช่องที่ 3 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup B1, ช่องที่ 4 และ 5 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup D และ ช่องที่ 6 และ 7 เป็นเชื้อ *E. coli* phylogroup B2)

ที่มา: Clermont และคณะ (2000)

เชื้อ *E. coli* ทั้ง 4 phylogroups มีความแตกต่างของ phenotypic characteristics เช่น ความสามารถในการใช้น้ำตาล antibiotic resistance profile และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างในด้าน genotypic characteristics อีกด้วย

Carlos และคณะ (2010) ใช้เทคนิค phylotyping ในการศึกษาการกระจายของสายพันธุ์แบบ phylogenetic group ในเชื้อ *E. coli* ที่พบในมนุษย์ โค ไก่ แพะ แกะ และ สุกร พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมนุษย์และสุกร มีการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ครบทุก phylogenetic group ได้แก่ phylogroup A, B1, B2 และ D นอกจากนี้ ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* phylogroup B2 ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาก โค แกะ และ แพะ รวมไปถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* phylogroup D ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จาก ไก่ และ แพะ

Wang และคณะ (2017) ใช้เทคนิค phylotyping จำแนกเชื้อ diarrheagenic *E. coli* (DEC) ซึ่งถูกแยกจากเนื้อโค เนื้อสุกร เนื้อไก่ ปลา ผักและผลไม้ ที่ถูกสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดในประเทศญี่ปุ่น พบว่าเกือบร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่แยกจากเนื้อโค เนื้อหมู เนื้อไก่ และอาหารพร้อมรับประทานมีเชื้อ *E. coli* phylogroup A ในขณะที่เชื้อ *E. coli* phylogroup B1 จะพบมากในเนื้อปลา ผักและผลไม้

ในขณะที่ Pavlickoova และคณะ (2017) ได้เปรียบเทียบการสร้างไบโอฟิลม์ในเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากเนื้อไก่กับ phylogenetic group พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่แยกจากเนื้อไก่สามารถสร้างไบโอฟิลม์บนพื้นผิว polystyrene ได้ นอกจากนี้เชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากอาหารสามารถมีชีวิตอยู่ได้บนพื้นผิวของเครื่องมือที่ใช้แปรรูปอาหารและทนทานต่อการล้างทำความสะอาด ทำให้สามารถย้อนกลับมาปนเปื้อนในกระบวนการอีกครั้งได้ ซึ่งเชื้อที่สามารถสร้างไบโอฟิลม์ได้ดีส่วนใหญ่จะอยู่ใน phylogroup A

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

เนื้อสุกรปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็งผลิตจากโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออกแห่งหนึ่ง ซึ่งได้รับการรับรองระบบสุขลักษณะที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practice หรือ GMP) และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point หรือ HACCP) จากกรมปศุสัตว์

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.2.1 Butterfield' s buffered phosphate diluent (BPB) (Merck, Germany)

3.2.2 *Escherichia coli* broth (EC broth) (TM media, India)

3.2.3 Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (Oxoid, USA)

3.2.4 Lactose broth (Oxoid, USA)

3.2.5 Peptone (Oxoid, USA)

3.2.6 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

3.2.7 Sodium Hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)

3.2.8 Hydrochloric acid (HCl) (Merck, Germany)

3.2.9 น้ำกลั่น

3.2.10 แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates (3M, USA)

3.2.11 แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates (3M, USA)

3.3 เครื่องมือ

3.3.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 35°C รุ่น BD 720 (Binder, Germany)

3.3.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 44.5°C รุ่น MEM-1WNE45 (Memmert, Germany)

3.3.3 เครื่องตีปั่น (Stomacher) model 400 circulator (Seward, England)

3.3.4 เครื่องชั่ง (Balance) รุ่น Adventurer TM ARC 120 (Ohaus, USA)

3.3.5 ตู้เย็น (Refrigerator) รุ่น HR-38 (Bio pluss, ประเทศไทย)

3.3.6 ตู้เย็นเก็บเชื้อจุลินทรีย์ (Refrigerator) รุ่น MPR-214F (Sanyo, Japan)

3.3.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) 121°C รุ่น HVA-50 (HirayamaIR, Japan)

3.3.8 รถเข็นสแตนเลส (Stainless cart)

3.3.9 ตู้นึ่งไอน้ำ (Box steamer) รุ่น EK-A5929 (Aek polytech, Thailand)

3.3.10 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560E (Scientific Industries, USA)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.4.2 ปิเปตขนาด 1 หรือ 10 มิลลิลิตร

3.4.3 หลอดทดลอง

3.4.4 จานเพาะเชื้อ

3.4.5 ไม้พันสำลีขนาด 15 เซนติเมตร

3.4.6 ตะเกียงแก๊ส

3.4.7 กรรไกรตัดตัวอย่าง

3.4.8 ปากคีบ

3.4.9 หลอดดักแก๊ส

3.5 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

3.5.1 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC11303 สำหรับอ้างอิง phylogroup A จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.5.2 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC10536 สำหรับอ้างอิง phylogroup B1 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.5.3 เชื้อ *E. coli* (O157:H7) สายพันธุ์ ATCC43888 สำหรับอ้างอิง phylogroup D จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.6 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

3.6.1 ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิต บริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก

3.6.1.1 การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงแช่เยือกแข็ง

ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่มีการผลิตเฉพาะในกะกลางวัน ซึ่งมีการผลิตในระยะเวลาไม่เกิน 10 ชั่วโมงต่อการผลิต โดยแบ่งช่วงการเก็บตัวอย่างเป็น 2 เวลา ได้แก่ ช่วงเช้าและช่วงบ่าย ในช่วงเช้าเก็บตัวอย่างที่การผลิตกะ (batch) แรก เวลาประมาณ 7.30 – 8. 30 น. และในช่วงบ่ายหลังพักกลางวัน เก็บตัวอย่าง เมื่อเริ่มผลิตเวลา 13.00 น. ทำการเก็บตัวอย่าง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลาทำทั้งสิ้น 10 สัปดาห์ ในเดือนมกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2561โดยจากขั้นตอนการผลิตในภาพที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งถูกเก็บตัวอย่างในแต่ละขั้นตอน ตั้งแต่กระบวนการให้ความร้อนไปจนถึงกระบวนการแช่เยือกแข็ง บริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก (post heating area) ทั้งหมด 5 ขั้นตอน ได้แก่

1) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน
2) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกแป้ง
3) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกน้ำแป้งเหลว
4) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกเกล็ดขนมปัง
5) ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง

การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนถูกเก็บครั้งละประมาณ 300 กรัม ใช้ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วรองรับผลิตภัณฑ์จากสายพาน หรือที่ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยิบตัวอย่างจากสายพาน โดยไม่ให้สัมผัสถูกมือหรือพื้นผิวของถุงด้านนอก ส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการที่อยู่ภายในโรงงานในระยะเวลาไม่เกิน 15 นาที หลังจากเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างไปจัดเก็บในตู้เย็นของห้องปฏิบัติการควบคุมอุณหภูมิ 2 – 8 ^{o}C โดยตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์ตรวจหาเชื้อ *E. coli* ภายในวันที่เก็บตัวอย่าง

3.6.1.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์

การตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ ใช้วิธีการตรวจตามที่คู่ค้ากำหนด (in house method) ซึ่งได้ผ่านการทำทดลองควบคู่กับการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม ตามวิธี BAM 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria (Bacteriological Analytical Manual, BAM) ปี ค.ศ. 2002 พบว่าวิธีการทดสอบตามที่คู่ค้ากำหนด สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* ได้เช่นเดียวกัน โดยมีวิธี ดังนี้

1) สุ่มตัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนให้ได้น้ำหนัก 50 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ใส่ตัวอย่างในถุงปลอดเชื้อ

2) เติม BPB diluent จำนวน 450 มิลลิลิตร จากนั้น นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) เพื่อปั่นตัวอย่างให้ละเอียด เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลาประมาณ 1 นาที

3) ทำการดูดตัวอย่างที่ได้ จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ EC broth ที่มีปริมาตร 17 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5 $\pm$ 0.2^{o}C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

4) ทำการตรวจสอบการเกิดแก๊สที่ EC broth หากพบแก๊สให้ถ่ายเชื้อจาก EC broth โดยทำการเขี่ยเชื้อลงใน EMB agar จากนั้น นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 1^{o}C โดยใช้ตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นเวลา 24 $\pm$ 2 ชั่วโมง ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar มีลักษณะเป็นสีม่วงหรือดำ อาจเกิดหรือไม่เกิด metallic sheen คือมีสีเขียวเหลือบคล้ายสีของปีกแมลงทับ

5) นำจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{o}C เพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาโดยทำการสุ่มเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar โดยมีลักษณะของโคโลนีเป็นสีม่วงหรือสีดำ อาจเกิดหรือไม่เกิด Metallic sheen คือมีสีเขียวเหลือบคล้ายสีของปีกแมลงทับ ไปวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group

3.6.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก

3.6.2.1 การเก็บตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมบริเวณกระบวนการผลิต

เริ่มจากการแบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมบริเวณการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งหลังกระบวนการให้ความร้อน (post heating area) ตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ (พรรณิดา, 2553) โดยแบ่งออกเป็น 3 โซน (zone) ได้แก่ โซนที่ 1 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์

โดยตรง (the product-contact surfaces) เป็นบริเวณที่มีความเสี่ยงสูงสุด เนื่องจากมีความใกล้ชิดกับผลิตภัณฑ์มากที่สุด เช่น สายพานลำเลียง เครื่องจักรที่ใช้คลุกส่วนผสม รวมไปถึงมือพนักงาน ถัดมาเป็นโซนที่ 2 ซึ่งเป็นโซนที่มีความเสี่ยงรองลงมา เป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง แต่อยู่ใกล้ผลิตภัณฑ์และพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยาก (the non-product contact surfaces in close proximity to the product) เช่น ตู้ควบคุมเครื่องจักรต่าง ๆ เครื่องชั่ง หรือ รถเข็น และโซนที่ 3 เป็นโซนที่มีความเสียงต่ำสุด ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์ (the non-product contact surfaces that are further away from the product) เช่น พื้น ผนังห้อง รางสายไฟ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 บริเวณเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

พื้นที่	บริเวณเก็บตัวอย่างด้วยวิธีสวอป (swab)	จำนวน (จุด)	พื้นที่สวอป (ตารางเซนติเมตร)
โซน 1	เครื่องคลุกแป้ง คลุกน้ำแป้ง และคลุกเกล็ดขนมปัง	3	100
	เครื่องผสมน้ำแป้ง	1	100
	เครื่องร่อนแป้ง	1	100
	สายพานเครื่องบดขนมปัง	1	100
	สายพานขาเข้าและขาออกที่จุดต่างๆ	4	100
	ถุงมือพนักงาน	2	พื้นที่ทั้งหมด
	รวม	12	
โซน 2	ตู้ควบคุมเครื่องจักรและบริเวณท้ายเครื่องนึ่งไอน้ำ	2	100
	เครื่องชั่ง และรถเข็น	2	100
	ปากทางออกของท่อน้ำในห้องผสมแป้ง	1	พื้นที่ทั้งหมด
	รวม	5	
โซน 3	รางสายไฟ	1	100
	ผนังพื้นที่การผลิต ห้องเตรียมวัตถุดิบ ห้องล้าง	5	100
	พื้นของพื้นที่การผลิต ห้องเตรียมวัตถุดิบ ห้องล้าง	5	100
	รวม	11	
	รวมทั้งสิ้น	28	

จากนั้นสวอป (swab) พื้นผิวของโซนที่บริเวณต่างๆ ที่มีโอกาสเจอเชื้อ *E. coli* รวม 28 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 3.1 โดยเก็บตัวอย่าง 2 เวลาต่อวัน ได้แก่ ช่วงเช้าและช่วงบ่าย ในช่วงเช้าเก็บตัวอย่างก่อนเริ่มผลิตเวลา 7.00 น. และหลังพักกลางวันเวลา 13.00 น. เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้นรวม 10 สัปดาห์ นำมาตรวจวิเคราะห์การมีอยู่ของเชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อม ใช้วิธีการตรวจตามที่คู่ค้ากำหนด

3.6.2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อมบริเวณกระบวนการผลิต

1) สวอปพื้นผิวด้วยไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ชุ่มด้วยสารละลาย peptone broth ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บนพื้นผิวสิ่งแวดล้อม พื้นที่สวอปขึ้นอยู่กับพื้นผิวสิ่งแวดล้อม โดยพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดมากกว่า 100 ตารางเซนติเมตร เช่น พื้นผิวสายพาน พื้น ผนัง เป็นต้น ทำการสวอปพื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตร (ISO 18593, 2004) และพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดน้อยกว่า 100 ตารางซนติเมตร เช่น ถุงมือพนักงาน ลูกกลิ้งสายพาน เป็นต้น ใช้การสวอปพื้นที่ผิวทั้งหมด ดังตารางที่ 3.1

2) นำไม้พันสำลีที่สวอปพื้นผิวแล้วไปวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อ *E coli* ตามวิธีที่คู่ค้ากำหนด (in house method) โดยใส่ไม้พันสำลีที่สวอปพื้นผิวลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ EC broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด นำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5 $\pm$ 0.2 ^{o}C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

3) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 22 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการเกิดแก๊สที่ EC broth หากพบแก๊สให้ถ่ายเชื้อจาก EC broth โดยทำการเขี่ยเชื้อลงใน EMB agar จากนั้น นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 1^{o}C โดยใช้ตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นเวลา 24 $\pm$ 2 ชั่วโมง ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar มีลักษณะเป็นสีม่วงหรือดำ อาจเกิดหรือไม่เกิด metallic sheen คือมีสีเขียวเหลือบคล้ายสีของปีกแมลงทับ

4) นำจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4^{o}C เพื่อนำส่งห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา โดยทำการสุ่มเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีลักษณะแตกต่างกันบน EMB agar ไปวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group

3.6.3 การระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก

นำเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก จากข้อ 3.7.1 และ 3.7.2 ส่งตรวจสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี phylogenetic group ที่พัฒนาจากวิธีของ Clermont และคณะ (2000) ซึ่งใช้ยีน (gene) 2 ชนิด ได้แก่ *chuA* ซึ่งใช้ยีน (gene) 2 ชนิด ได้แก่ *chuA* และ *yjaA* และใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (DNA fragment) ที่เรียกว่า TSPE4.C2 โดยตรวจสอบร่วมกับเชื้อเชื้อ *E. coli* ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง ณ ห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยาแห่งหนึ่ง

จากนั้น ทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ phylogenetic group ของเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก ร่วมกับสายพันธุ์ phylogenetic group ของเชื้อ *E. coli* ที่ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง รวมถึง สายพันธุ์ก่อโรค เช่น serotype 0157:H7

3.6.4 การศึกษาความสอดคล้องของการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

นำผลการปนเปื้อนและการแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในผลิตภัณฑ์และพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง จากข้อ 3.6.3 มาประเมินความสอดคล้อง โดยเชื้อ *E. coli* ที่มี phylogenetic group เหมือนกัน มีโอกาสที่จะมาจากแหล่งการปนเปื้อนเดียวกัน ดังตัวอย่างในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มาประเมินความสอดคล้อง โดยวิธี phylogenetic group

หมายเลขตัวอย่าง	จุดที่พบเชื้อ *E. coli*	Gene *chu A*	Gene *yia A*	DNA fragment TSPE4.C2	Phylogenetic group
1	พื้นโรงงาน	+	-	-	D
2	ล้อรถเข็น	+	+	-	B2
3	ผลิตภัณฑ์ ก	+	-	-	D
4	ผลิตภัณฑ์ ข	+	+	-	B2

จากตารางที่ 3.2 เชื้อ *E. coli* ที่พบบริเวณพื้นโรงงานและผลิตภัณฑ์ ก เป็นเชื้อ *E. coli* ที่มี phylogroup D เนื่องจากปรากฏเฉพาะยีน *chuA* สามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสที่ผลิตภัณฑ์ ก มี

แหล่งปนเปื้อนมาจากบริเวณพื้นโรงงานและในส่วนของเชื้อ *E. coli* ที่พบบริเวณล้อรถเข็นและผลิตภัณฑ์ ข เป็นเชื้อ *E. coli* ที่มี phylogroup B2 เนื่องจากปรากฏยีน *chuA* และยีน *yjaA* สามารถประเมินได้เช่นเดียวกันว่า ผลิตภัณฑ์ ข มีแหล่งปนเปื้อนมาจากบริเวณล้อรถเข็น เป็นต้น ดังนั้นสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง มาจำแนกแหล่งสะสมของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนข้ามจากกระบวนการผลิตไปยังผลิตภัณฑ์ เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งได้ เพื่อนำไปสู่การแก้ไขและปรับปรุงในขั้นตอนต่อไป

3.6.5 การศึกษาวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

นำผลจำแนกแหล่งสะสมของเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนข้ามจากกระบวนการผลิตไปยังผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง จากข้อ 3.6.4 และผลการสวอปบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก ทำการคัดเลือกบริเวณที่มีความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* สูงบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อม มาศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ปรับความถี่ในการทำความสะอาด ปรับวิธีฆ่าเชื้อโดยการใช้สารฆ่าเชื้อ (sanitizer) หรือ ปรับวิธีฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ (steam) โดยวิธีการลดการปนเปื้อนที่เหมาะสมนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพิจารณาถึงปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องร่วมด้วย เช่น ต้นทุนการผลิตสินค้า ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงความปลอดภัยในการปฏิบัติงานของพนักงาน เนื่องจากทางผู้ผลิตมีการดำเนินการภายใต้ระบบการจัดการด้านอื่นๆ นอกจากระบบ GMP และ HACCP ได้แก่ ระบบการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม (ISO 14001 : 2015) และระบบการจัดการอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน (OHSAS 18001 : 2007) โดยนำแต่ละวิธีมาเปรียบเทียบในแต่ละปัจจัย จากนั้นคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดมาทำการศึกษาการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมต่อไป

3.6.6 การศึกษาผลของไอน้ำที่มีผลต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

3.6.6.1 การเตรียมรถเข็น

นำรถเข็นที่ผ่านการใช้งานในขั้นตอนขนย้ายถังบรรจุน้ำแป้งที่ผสมไปยังพื้นที่การผลิต ไปล้างทำความสะอาดคราบสกปรก เช่น ไขมันและน้ำแป้ง ด้วยวิธีการทำความสะอาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันของโรงงาน ดังนี้

1) กำจัดคราบสกปรกโดยขัดล้างรถเข็นด้วยฟองน้ำและน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2

2) ล้างทำความสะอาดคราบสบู่ด้วยน้ำสะอาด (อุณหภูมิห้อง)

3.6.6.2 การฆ่าเชื้อรถเข็นด้วยไอน้ำ

นำรถเข็นที่เตรียมจากข้อ 3.6.6.1 มาทำการทดลองฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำ โดยใช้อุณหภูมิของไอน้ำในระดับพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) โดยแบ่งการทดลอง ออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

1) ฆ่าเชื้อรถเข็นที่อุณหภูมิ 85 ^{o}C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที

2) ฆ่าเชื้อรถเข็นที่อุณหภูมิ 90 ^{o}C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที

3) ฆ่าเชื้อรถเข็นที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที

3.6.6.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในรถเข็น

ทำการสวอปรถเข็นเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*, coliforms และจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ในแต่ละขั้นตอนการทำความสะอาดในข้อ 3.6.6.1 (หลังล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และหลังล้างรถเข็นด้วยน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง) รวมไปถึง สวอปรถเข็นหลังราดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82^{o}C ซึ่งเป็นวิธีการฆ่าเชื้อที่ทางโรงงานใช้ในปัจจุบัน และรถเข็นที่นำไปทดลองฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 85, 90 และ 95 ^{o}C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที ตามลำดับในข้อ 3.6.6.2 โดยสวอปตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างสวอปมาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ด้วยวิธีที่คู่ค้ากำหนด , เชื้อ coliforms ด้วยแผ่นทดสอบ 3M Petrifilm^{TM} *E. coli*/coliform count plates (AOAC Official 991.14, 1991) และจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยแผ่นทดสอบ 3M Petrifilm^{TM} Aerobic Count Plates (AOAC Official 990.12, 1990) โดยนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการลดเชื้อ *E. coli*, coliforms และจุลินทรีย์ทั้งหมดในรถเข็น ระหว่างวิธีการฆ่าเชื้อที่ทางโรงงานใช้ในปัจจุบันและวิธีการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ โดยใช้เกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเพื่อควบคุมคุณภาพภายในโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออก รวมไปถึง นำผลที่ได้มาสรุปสภาวะที่เหมาะสมของการฆ่าเชื้อรถเข็นด้วยไอน้ำเพื่อกำหนดเป็นวิธีการปฏิบัติงานในการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวของรถเข็นอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

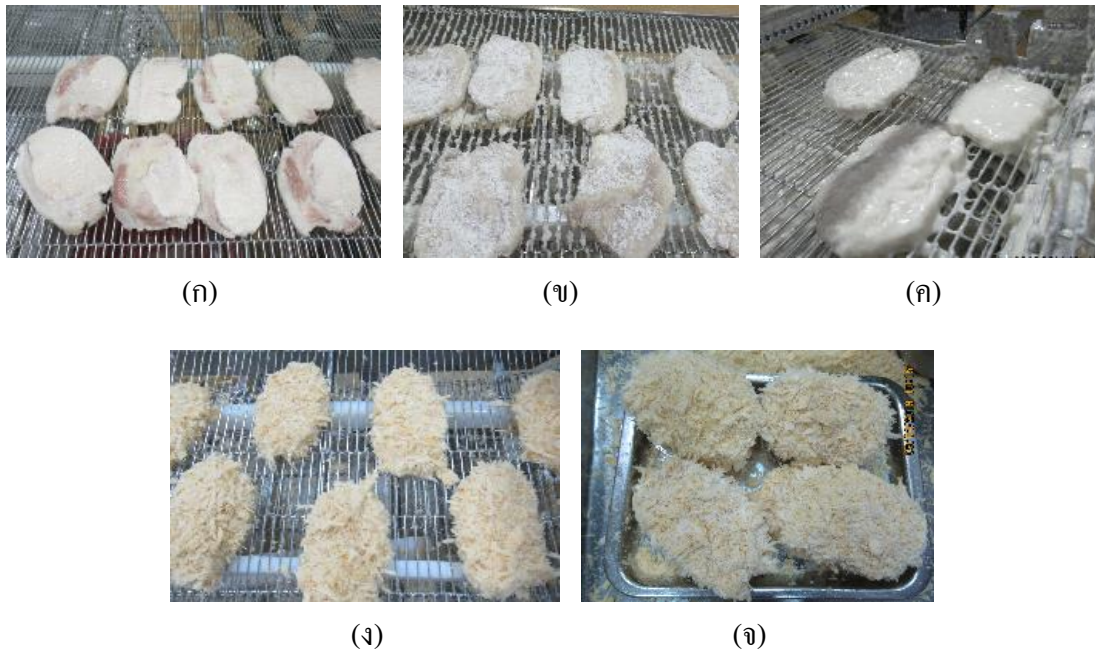
4.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก

จากการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งประเภทเนื้อสุกรปรุงสุกคลุกเกล็ดขนมปังแช่เยือกแข็ง (frozen steamed-breaded meat) ในแต่ละขั้นตอน ตั้งแต่กระบวนการให้ความร้อนไปจนถึงกระบวนการแช่เยือกแข็ง ในบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก (post heating area) ทั้งหมด 5 ขั้นตอนได้แก่ ผลิตภัณฑ์หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกแป้ง ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกน้ำแป้งเหลว ผลิตภัณฑ์หลังผ่านการคลุกเกล็ดขนมปัง และผลิตภัณฑ์หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง ดังภาพที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 100°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 นาที 30 วินาที (ระยะเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับน้ำหนักและความหนาของชิ้นเนื้อหลังสไลด์) โดยเครื่องนึ่งไอน้ำ (steamer) ถูกลำเลียงบนสายพานลำเลียงเข้าสู่เครื่องคลุกแป้งและเครื่องคลุกน้ำแป้งเพื่อให้ผลิตภัณฑ์คลุกเคล้ากับแป้งและน้ำแป้งเหลวให้ทั่วทั้งชิ้นผลิตภัณฑ์ จากนั้น ลำเลียงผลิตภัณฑ์เข้าสู่เครื่องคลุกเกล็ดขนมปังเพื่อให้เกล็ดขนมปังปกคลุมทั่วชิ้นผลิตภัณฑ์ และสุดท้ายนำไปแช่เยือกแข็งโดยเครื่องแช่เยือกแข็ง (freezer) ก่อนนำไปบรรจุถุง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเช้าและช่วงบ่าย ทั้งหมดจำนวน 100 ตัวอย่าง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 10 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงมีนาคม พ.ศ. 2561 มาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อ *E. coli*

ผลการตรวจสอบไม่พบตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* (ตารางที่ 4.1) เนื่องจากตัวอย่างเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมูปรุงสุกที่ผ่านการให้ความร้อนในระดับที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ (Stringer et al., 2000) และมีการควบคุมสุขลักษณะของพนักงาน อุปกรณ์ และเครื่องจักรที่ดี โดยผู้ผลิตดำเนินการตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) มีการกำหนดมาตรฐานและความถี่ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ เครื่องจักรและมือพนักงาน ซึ่งเป็นเอกสารวิธีปฏิบัติงานอย่างชัดเจน เพื่อใช้ในการให้ความรู้และฝึกอบรมพนักงานและป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ไปยังผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงมีนาคม พ.ศ. 2561

เนื้อสุกรปรุงสุกในแต่ละขั้นตอน	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่พบเชื้อ *E. coli*	ร้อยละการพบเชื้อ *E. coli*
1) หลังผ่านการให้ความร้อน	20	0	0
2) หลังผ่านการคลุกแป้ง	20	0	0
3) หลังผ่านการคลุกน้ำแป้งเหลว	20	0	0
4) หลังผ่านการคลุกเกล็ดขนมปัง	20	0	0
5) หลังผ่านการแช่เยือกแข็ง	20	0	0
รวมทั้งสิ้น	100	0	0



(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

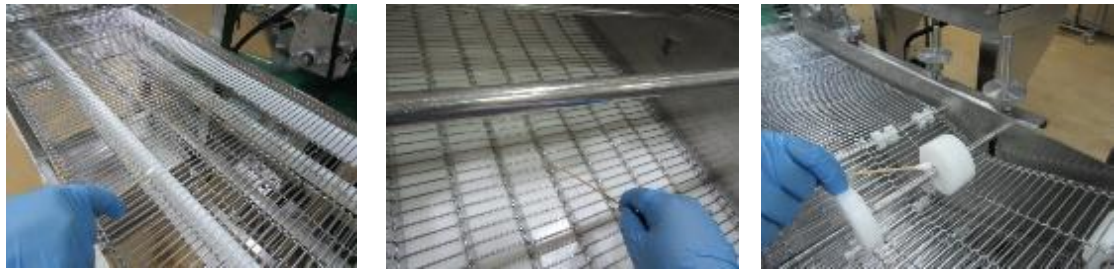
ภาพที่ 4.1 เนื้อสุกรหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน (ก) เนื้อสุกรปรุงสุกหลังผ่านการคลุกแป้ง (ข) เนื้อสุกรปรุงสุกหลังผ่านการคลุกน้ำแป้งเหลว (ค) เนื้อสุกรปรุงสุกหลังผ่านการคลุกเกล็ดขนมปัง (ง) และเนื้อสุกรปรุงสุกหลังผ่านการแช่เยือกแข็ง (จ)

4.2 ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก

พื้นที่หลังการปรุงสุกหรือหลังกระบวนการให้ความร้อน (post-heating area) เป็นบริเวณ

ถัดจากเครื่องนึ่งไอน้ำ ถูกแยกออกจากพื้นที่ก่อนการปรุงสุกหรือก่อนกระบวนการให้ความร้อน (pre-heating area) โดยมีการกั้นผนังถาวร แยกระบบท่อระบายน้ำ รวมไปถึงการแยกเครื่องจักร อุปกรณ์ และพนักงานอย่างชัดเจน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ระหว่างพื้นที่ก่อนและหลังการปรุงสุก พื้นที่หลังการปรุงสุกสามารถแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ ได้แก่ 1. พื้นที่กระบวนการผลิตสินค้า (line processing area) ประกอบไปด้วยเครื่องจักรที่ติดตั้งหลังเครื่องนึ่งไอน้ำ ได้แก่ สายพานลำเลียงขาเข้า-ออกจุดต่างๆ เครื่องคลุกแป้ง เครื่องคลุกน้ำแป้ง และเครื่องคลุกเกล็ดขนมปัง 2. พื้นที่เตรียมส่วนผสม (ingredient preparation area) ประกอบไปด้วย ห้องเตรียมแป้ง ห้องเตรียมน้ำแป้ง และห้องเตรียมเกล็ดขนมปัง และ 3. ห้องล้างทำความสะอาดเครื่องจักร

จากการเก็บตัวอย่างสวอป (swab) บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในการผลิตส่วนหลังกระบวนการให้ความร้อนทั้งหมด 560 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างจากโซนที่ 1 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง เช่น สายพานลำเลียง เครื่องคลุกแป้ง เครื่องคลุกน้ำแป้ง ดังภาพที่ 4.2 รวมไปถึงเครื่องคลุกเกล็ดขนมปัง เครื่องผสมน้ำแป้ง และ มือพนักงาน ดังภาพที่ 4.3 จำนวนทั้งหมด 240 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากโซนที่ 2 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง เช่น รถเข็น เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมเครื่องจักร ดังภาพที่ 4.4 จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากโซนที่ 3 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์ เช่น ผนัง พื้นห้อง รางสายไฟ ดังภาพที่ 4.5 จำนวนทั้งหมด 220 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเช้าและช่วงบ่าย เป็นระยะเวลาทั้งสิ้นรวม 10 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงมีนาคม พ.ศ. 2561 นำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งผลการตรวจสอบไม่พบเชื้อ *E. coli* ในบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนที่ 1 ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 4.00 ในบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมโซนที่ 2 และตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 4.09 ในบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมโซนที่ 3 ดังตารางที่ 4.2



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.2 สายพานลำเลียง (ก) เครื่องคลุกแป้ง (ข) เครื่องคลุกน้ำแป้ง (ค) เป็นพื้นที่โซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.3 เครื่องคลุกเกล็ดขนมปัง (ก) เครื่องผสมน้ำแป้ง (ข) มือพนักงาน (ค) เป็นพื้นที่โซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.4 รถเข็น (ก) เครื่องชั่ง (ข) ตู้ควบคุมเครื่องจักร (ค) พื้นที่โซนที่ 2 เป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.5 ผนัง (ก) พื้นห้อง (ข) รางสายไฟ (ค) พื้นที่โซนที่ 3 เป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังกระบวนการให้ความร้อน ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงมีนาคม พ.ศ. 2561

โซน	บริเวณเก็บตัวอย่างด้วยวิธีสวอป	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่พบเชื้อ *E.coli*	ร้อยละการพบเชื้อ *E. coli*
1	เครื่องคลุกแป้ง น้ำแป้ง และขนมปัง	60	0	0
	เครื่องผสมน้ำแป้งและร่อนแป้ง	40	0	0
	สายพานเครื่องบดขนมปัง	20	0	0
	สายพานขาเข้าและออกที่จุดต่างๆ	80	0	0
	ถุงมือพนักงาน	40	0	0
	รวม	240	0	0
2	ตู้ควบคุมเครื่องจักร	20	0	0
	บริเวณท้ายเครื่องนึ่งไอน้ำ	20	0	0
	เครื่องชั่ง	20	0	0
	รถเข็น	20	4	20.00
	ทางออกของท่อน้ำห้องผสมแป้ง	20	0	0
	รวม	100	4	4.00
3	รางสายไฟ	20	0	0
	ผนังพื้นที่การผลิต	20	0	0
	ผนังห้องร่อนแป้ง	20	0	0
	ผนังห้องผสมน้ำแป้ง	20	0	0
	ผนังห้องเตรียมเกล็ดขนมปัง	20	0	0
	ผนังห้องล้างเครื่องจักร	20	0	0
	พื้นของพื้นที่การผลิต	20	0	0
	พื้นห้องร่อนแป้ง	20	0	0
	พื้นห้องผสมน้ำแป้ง	20	9	45.00
	พื้นห้องเตรียมเกล็ดขนมปัง	20	0	0
	พื้นห้องล้างเครื่องจักร	20	0	0
	รวม	220	9	4.09
	รวมทั้งสิ้น	560	13	2.32

จากตารางที่ 4.2 การตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* ในบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมโซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง ทั้งในช่วงเช้าและช่วงบ่ายของการเก็บตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าการทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อบริเวณสัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* โดยทางผู้ผลิตมีการกำหนดขั้นตอนการล้างทำความสะอาดเครื่องจักรที่ใช้ในกระบวนการผลิต ทุกครั้งหลังเลิกงานในตอนเย็น ดังนี้

1) กำจัดเศษสิ่งสกปรกออกจากเครื่องจักร

2) ล้างกำจัดคราบสกปรกโดยใช้แปรงขัดและน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2

3) ฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อประเภทสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium compound) ความเข้มข้น 200 ppm

อย่างไรก็ตาม จากการเก็บตัวอย่างสวอปยังคงตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้สำหรับขนย้ายถังบรรจุน้ำแป้งหลังผสมไปยังเครื่องคลุกน้ำแป้งในพื้นที่กระบวนการผลิต ซึ่งเป็นพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมโซนที่ 2 ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ทั้งการเก็บตัวอย่างในช่วงเช้าและช่วงบ่าย (ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในช่วงเช้า 2 ครั้งจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 ครั้ง และตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในช่วงบ่าย 2 ครั้งจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 ครั้ง) แสดงให้เห็นว่า การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อบริเวณรถเข็นไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* สอดคล้องกับการศึกษาของ Schlegelova และคณะ (2010) ที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปอุปกรณ์ประเภทรถเข็นในโรงเชือดสุกร เนื่องจากมีการสัมผัสกับชิ้นส่วนของซากสุกรในระหว่างการขนย้าย

ทางผู้ผลิตมีการกำหนดขั้นตอนการล้างทำความสะอาดรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิต (ภาพที่ 4.6) ดังนี้

1) กำจัดคราบสกปรกโดยขัดล้างด้วยฟองน้ำและน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2

2) ล้างคราบสบู่ด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง

3) ฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C

จากการสังเกตการล้างทำความสะอาดรถเข็น ในขั้นตอนการล้างคราบสบู่และฆ่าเชื้อโดยราดรถเข็นด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C พบว่า มีการกระเด็นของน้ำร้อนที่ใช้ราดรถเข็นจากพื้นกลับมายังรถเข็นอีกครั้ง ซึ่งไม่สอดคล้องตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* จากพื้นมาสู่รถเข็นได้ (ภาพที่ 4.6 ข และ ค) และการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในพื้นห้องสำหรับผสมน้ำแป้งที่เป็นบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมโซนที่ 3 โดยมักพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปในเวลาช่วงเช้ามากกว่าในช่วงบ่าย (ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในช่วงเช้า 7 ครั้งจากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 ครั้ง และตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในช่วงบ่าย 2 ครั้งจาก

การเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 ครั้ง) โดยทางผู้ผลิตมีการกำหนดขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นห้องดังนี้

1) ขัดพื้นห้องด้วยแปรงขัดและน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2

2) ล้างคราบสบู่ด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง

3) ฆ่าเชื้อด้วยการราดด้วยคลอรีนความเข้มข้น 200 ppm

จากผลการสวอปแสดงให้เห็นว่า การทำความสะอาดพื้นห้องในเวลาเลิกงานในตอนเย็นไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ในบริเวณพื้นห้อง จึงทำให้มีการเหลือรอดของเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นห้องผสมน้ำแป้งในช่วงเช้าของวันถัดไป

(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 4.6 การล้างรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิต เริ่มจาก ขัดล้างด้วยฟองน้ำและน้ำสบู่ (ก) ล้างคราบสบู่ด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (ข) และฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C (ค)

4.3 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในแต่ละขั้นตอนการผลิตและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก

จากการนำเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบปนเปื้อนในพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุกจากตารางที่ 4.1 จำนวน 13 ตัวอย่าง ส่งตรวจสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ที่พัฒนาจากวิธีของ Clermont และคณะ (2000) ซึ่งใช้ยีน (gene) 2 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *chuA* และ *yjaA* และใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (DNA fragment) ที่เรียกว่า TSPE4.C2 โดย ยีน *chuA* จะปรากฏเฉพาะสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D ดังนั้นสามารถใช้ยีน *chuA* แยกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D ออกจากเชื้อ *E. coli* phylogroup A และ B1 ได้ ในส่วนของยีน *yjaA* สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *E. coli* ใน phylogroup B2 และ D

ออกจากกัน เนื่องจากยีน *yjaA* จะปรากฏในเชื้อ *E. coli* phylogroup B2 เท่านั้น สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* phylogroup A และ B1 จะใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 โดยจะปรากฏชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 ในเชื้อ *E. coli* phylogroup B1 และเมื่อนำเชื้อ *E. coli* ที่ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงไปจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี phylogenetic group พบว่า เชื้อ *E. coli* ATCC43888 (O157:H7) ที่เป็นเชื้อก่อโรคเป็นสายพันธุ์ phylogroup D เชื้อ *E. coli* ATCC11303 เป็นสายพันธุ์ phylogroup A และ เชื้อ *E. coli* ATCC10536 เป็นสายพันธุ์ phylogroup B1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงตามวิธี phylogenetic group

เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง	*chuA*	*yjaA*	TSPE4.C2	Phylogenic groups
E. coli ATCC43888 (O157:H7)	+	-	-	D
E. coli ATCC11303	-	-	-	A
E. coli ATCC10536	-	-	+	B1

+ คือ ปรากฏชิ้นส่วนของยีนหรือชิ้นส่วนสารพันธุกรรม

- คือ ไม่ปรากฏชิ้นส่วนของยีนหรือชิ้นส่วนสารพันธุกรรม

ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในตัวอย่างสวอปจากรถเข็นและพื้นห้องผสมน้ำแป้ง พบว่าเป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ phylogroup A ทั้งหมด และเมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบ phylogenetic group กับสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรค (serotype O157:H7) พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบจากการสวอปพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุกมี phylogenetic group ที่แตกต่างกับสายพันธุ์ก่อโรค (serotype O157:H7) โดยสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรค เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ phylogroup D ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* ในพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุกโดยวิธี phylogenetic group

โซน	พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมที่ทำการสวอป	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีที่ตรวจ	Phylogenic groups
2	รถเข็น	4	8	A
3	พื้นห้องผสมน้ำแป้ง	9	18	A

จากการสวอปพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก ที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ phylogroup A และไม่พบเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ก่อโรคที่เป็น phylogroup D นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของมณฑล และชัยสิทธิ์ (2554) ที่ระบุว่าไม่ค่อยพบรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในลักษณะที่รุนแรงและเป็นวงกว้างในประเทศไทย แต่โดยส่วนใหญ่มักพบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในแถบทวีปอเมริกาเหนือ ประเทศอังกฤษและประเทศญี่ปุ่น และในปี พ.ศ. 2542 – 2544 ได้มีการสำรวจตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ จำนวน 170 ตัวอย่างและตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสียจำนวน 580 ตัวอย่างในภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่า มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหารเพียงร้อยละ 3.47 และไม่พบเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย โดยปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของ เชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านมามักเกิดในช่วงเวลาหลังฝนตกหนัก ซึ่งอาจมีการชะล้างเชื้อจากมูลสัตว์ที่ขับถ่ายทิ้งไว้และแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำ ดังนั้น การตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ก่อโรคในพื้นที่การผลิตหลังการปรุงสุก แสดงให้เห็นว่าการผลิตอาหารภายใต้การควบคุมสุขลักษณะที่ดี (GMP) รวมไปถึงการมีระบบการผลิตและบำบัดน้ำใช้ภายใต้ระบบ GMP ของผู้ผลิต สามารถป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งแวดล้อมภายนอกการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.4 การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์และในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

จากผลการตรวจสอบและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *E. coli* โดยวิธี phylogenetic group ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง พบว่าเป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ phylogroup A ทั้งในรถเข็น (โซนที่ 2) และพื้นห้องผสมน้ำแป้ง (โซนที่ 3) ดังตารางที่ 4.4 การตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่มีสายพันธุ์ phylogroup แบบเดียวกันทั้งใน 2 บริเวณ แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่อาจมีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* จากแหล่งเดียวกัน หรืออาจมีการปนเปื้อนข้ามจากบริเวณหนึ่งไปยังอีกบริเวณหนึ่ง ซึ่งการเตรียมน้ำแป้งเหลวเพื่อไปใช้ในการผลิตสินค้านั้น มีขั้นตอนการปฏิบัติงาน (ภาพที่ 4.7) ดังนี้

1) ใช้รถเข็นขนย้ายส่วนผสมมายังห้องผสมน้ำแป้งเพื่อนำไปผสมเป็นน้ำแป้งเหลว
2) ใช้รถเข็นคันเดิมขนย้ายถังบรรจุน้ำแป้งที่ผสมแล้วไปยังพื้นที่การผลิต

3) เทน้ำแป้งเหลวลงในเครื่องคลุกน้ำแป้ง โดยน้ำแป้งเหลวถูกเตรียมและนำไปเทลงเครื่องคลุกน้ำแป้งเหลว เพื่อใช้ผลิตสินค้าทุก 1 ชั่วโมง

4) นำรถเข็นไปส่งล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ห้องล้างอุปกรณ์

(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ 4.7 การใช้รถเข็นในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุก เริ่มจากรถเข็นขนย้ายส่วนผสมมายังห้องผสมน้ำแป้ง (ก) รถเข็นขนย้ายถังบรรจุน้ำแป้งที่ผสมแล้วไปยังพื้นที่การผลิต (ข) และ (ค) และการเทน้ำแป้งเหลวลงในเครื่องคลุกน้ำแป้ง (ง)

จากภาพที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า พนักงานมีการทำงานโดยใช้รถเข็นขนถ่ายส่วนผสมในหลายๆ ขั้นตอน ทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนข้ามเชื้อ *E. coli* จากพื้นที่ไม่สะอาดไปยังรถเข็น และเกิดการปนเปื้อนข้ามจากรถเข็นไปยังถังบรรจุน้ำแป้งเหลวได้ เมื่อนำถุงบรรจุส่วนผสมและถังบรรจุน้ำแป้งเหลวที่ผสมแล้ววางลงบนรถเข็น จากนั้นสามารถส่งต่อการปนเปื้อนข้ามไปยังมือพนักงานที่สัมผัสถังบรรจุน้ำแป้งเหลวในขณะที่เทน้ำแป้งเหลวลงในเครื่องคลุกน้ำแป้ง และมีโอกาสปนเปื้อนข้ามเชื้อ *E. coli* ไปสู่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในที่สุด ทำให้การตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ในบริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต ถึงแม้เป็นบริเวณพื้นผิวที่ไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง (โซนที่ 2 และโซนที่ 3) (Keeratipibul and Techaruwichit, 2012) อย่างไรก็ตาม จากการปฏิบัติงานของพนักงาน ทั้งการเตรียมวัตถุดิบ การขนส่งเคลื่อนย้ายวัตถุดิบ สามารถปนเปื้อนข้ามไปสู่พื้นผิวที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง (โซนที่ 1) และตัวผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ผลิตต้องมีการดำเนินการในการกำจัดการปนเปื้อนในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในแต่ละโซนอย่างมีประสิทธิภาพและปฏิบัติตามวิธีที่กำหนดอย่างเคร่งครัด เพื่อให้สามารถลดโอกาสในการปนเปื้อนข้ามจากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมไปสู่ผลิตภัณฑ์

4.5 การลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

การลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง สามารถทำได้โดยการล้างทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวของรถเข็นอย่างเหมาะสม โดยปกติทางผู้ผลิตมีการล้างทำความสะอาดรถเข็นทุกครั้งหลังจากใช้ขนย้ายน้ำแป้งเหลวหลังผสมไปยังกระบวนการผลิต โดยมีการล้างทำความสะอาด ดังภาพที่ 4.6 ด้วยการกำจัดคราบสกปรกโดยขัดล้างรถเข็นด้วยฟองน้ำและน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้น ล้างทำความสะอาดคราบสบู่ด้วยน้ำสะอาด (อุณหภูมิห้อง) และฆ่าเชื้อโดยการราดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C

จากการเก็บตัวอย่างสวอปพื้นผิวของรถเข็นในแต่ละขั้นตอนในการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโดยวิธีที่ผู้ผลิตใช้ในปัจจุบัน จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการลดเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็น พบเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวรถเข็นในทุกขั้นตอนของการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ โดยพบเชื้อ *E. coli* จากรถเข็นหลังล้างด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 2 ครั้ง จากรถเข็นหลังรถเข็นด้วยน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง และจากรถเข็นหลังราดด้วยน้ำร้อนที่อุญหภูมิไม่ต่ำว่า 82°C จำนวน 3 ครั้ง ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจพบเชื้อ *E. coli* จากการสวอปรถเข็นในแต่ละขั้นตอนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโดยวิธีที่ผู้ผลิตใช้ในปัจจุบัน

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดรถเข็น	จำนวนครั้งในการสวอป	จำนวนสวอปที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli*	จำนวนสวอปที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli*
- หลังล้างรถเข็นด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2	3	2	1
- หลังล้างรถเข็นด้วยน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง	3	3	0
- หลังราดรถเข็นด้วยน้ำร้อนที่อุญหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C	3	2	1

เมื่อพิจารณาการทำความสะอาดรถเข็นในแต่ละขั้นตอนโดยวิธีที่ผู้ผลิตใช้ในปัจจุบัน เริ่มจากการขัดล้างคราบสกปรกด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่า สบู่เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ทำหน้าที่ช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำได้ โดยมีโครงสร้างที่สำคัญ 2 ส่วนได้แก่ ด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สบู่มีหลักการทำงาน คือ อนุภาคของสิ่งสกปรกที่ไม่ชอบน้ำ เช่นไขมันและน้ำมัน เมื่อถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของสบู่ อนุภาคเหล่านี้ถูกยึดไว้ที่ปลายสุดของด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของสบู่ โดยปลายด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ของสบู่ยื่นออกไปด้านนอกเพื่อจับกับโมเลกุลของน้ำ จึงสามารถล้างสบู่ออกด้วยน้ำได้ ดังนั้น สบู่มีคุณสมบัติเพียงกำจัดคราบสกปรกออกจากพื้นผิวของรถเข็น ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) (Ross, 2016) จึงไม่สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็นได้ ถัดมาในส่วนของการล้างคราบสบู่ออกจากรถเข็นด้วยน้ำสะอาด เป็นเพียงการล้างคราบสกปรกและสารลดแรงตึงผิวออกจากพื้นผิวรถเข็น จึงไม่สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ออกจากพื้นผิวรถเข็นได้เช่นเดียวกัน และในส่วนของการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวรถเข็นโดยการราดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C พบว่า เป็นขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพ ไม่สามารถลดการเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็นได้ ซึ่งโดยทั่วไปการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ เช่น มีด ถาด หรืออุปกรณ์ที่มีขนาดเล็กอื่นๆ ที่สามารถแช่ในน้ำร้อนได้ทั่วทั้งอุปกรณ์ การฆ่าเชื้อโดยการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C นั้น เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป (Marriott, 1997) อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดทางด้านโครงสร้างของรถเข็น จึงไม่สามารถนำไปลวกในอ่างน้ำร้อนได้ทั้งคัน ทำให้ไม่สามารถควบคุมระยะเวลาสัมผัสระหว่างพื้นผิวรถเข็นและน้ำร้อน รวมไปถึงไม่สามารถควบคุมปริมาณน้ำร้อนให้สัมผัสครอบคลุมพื้นผิวของรถเข็นทั้งหมดได้ ถึงแม้ใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิสูง (ไม่ต่ำกว่า 82°C) ราดพื้นผิวรถเข็นแล้วก็ตาม จึงทำให้ตรวจพบเชื้อ *E.coli* หลังการทำความสะอาด (ตารางที่ 4.5) รวมไปถึงจากการสังเกตการล้างทำความสะอาดรถเข็นของพนักงาน พบว่า มีการกระเด็นของน้ำร้อนที่ใช้ราดรถเข็นจากพื้นกลับมายังรถเข็นอีกครั้ง ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* จากพื้นกลับมาสู่รถเข็นได้อีกด้วย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ผลิตต้องมีการปรับปรุงวิธีการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวของรถเข็นอย่างเหมาะสม

เมื่อพิจารณาวิธีการปรับปรุงเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็น พบว่าสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ปรับความถี่ในการทำความสะอาดโดยใช้วิธีเดิม หรือ เปลี่ยนวิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้สารฆ่าเชื้อ (sanitizer) หรือ เปลี่ยนวิธีการฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ (steam) เมื่อทำการเปรียบเทียบในหัวข้อต่างๆ ของการฆ่าเชื้อแต่ละวิธี เพื่อคัดเลือกวิธีที่เหมาะสม ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการฆ่าเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็น ระหว่าง การปรับความถี่ในการทำความสะอาดโดยใช้วิธีเดิม การใช้สารฆ่าเชื้อ และการฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ

หัวข้อ	วิธีการลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็น		
	การปรับความถี่การทำความสะอาด	การใช้สารฆ่าเชื้อ	การฆ่าเชื้อด้วยการใช้ไอน้ำ
1.ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ			
1.1 ความทั่วถึงในการฆ่าเชื้อ	ต่ำ	ต่ำ	สูง
1.2 ระยะเวลาสัมผัสในการฆ่าเชื้อ	ต่ำ	ต่ำ	สูง
2. ค่าใช้จ่ายในการฆ่าเชื้อ	สูง	ปานกลาง	ปานกลาง
3. โอกาสในการเกิดอุบัติเหตุ	สูง	สูง	ต่ำ
4. ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม			
4.1 การเกิดของเสีย	ปานกลาง	สูง	ต่ำ
4.2 การใช้ทรัพยากร	สูง	สูง	ปานกลาง

ที่มา : ข้อมูลผลการประเมินผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ความปลอดภัยในการปฏิบัติงานของพนักงาน และค่าใช้จ่ายการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ของโรงงานแปรรูปสุกรปรุงสุกแห่งหนึ่ง (2562) และ Marriott (1997)

จากตารางที่ 4.6 สามารถอธิบายว่า การปรับความถี่ในการทำความสะอาดของวิธีการทำความสะอาดแบบเดิม เป็นวิธีการปรับปรุงที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากปัญหาที่พบจากการทำความสะอาดโดยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน มีสาเหตุมาจากมีวิธีการฆ่าเชื้อ *E. coli* ที่ไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น ถึงแม้จะเพิ่มจำนวนครั้งในการทำความสะอาดรถเข็น แต่ทำความสะอาดโดยวิธีที่ไม่เหมาะสม ก็ยังคงมีโอกาสหลงเหลือการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็นดังเช่นเดิม รวมไปถึงค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำร้อนของผู้ผลิตเป็นค่าใช้จ่ายที่สูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานสูงในการผลิตน้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C และมีความจำเป็นที่ต้องต้มน้ำให้ร้อนตลอดเวลา เพื่อรักษาอุณหภูมิของน้ำให้ร้อนและพร้อมใช้สำหรับการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ ไม่ให้เกิดการรอเป็นระยะเวลานาน ซึ่งเป็นการสูญเสียเวลาในการผลิตสินค้าของผู้ผลิต รวมไปถึง มีพนักงานที่ประสบอุบัติเหตุจากการถูกน้ำร้อนลวกผิวหนังในขณะฆ่าเชื้ออุปกรณ์ด้วยน้ำร้อนจำนวนหลายรายในแต่ละปี ถัดมา ในส่วนของปรับปรุงการฆ่าเชื้อ *E. coli* โดยการใช้สารฆ่าเชื้อ (sanitizer) พบว่า เป็นวิธีการปรับปรุงที่ไม่

เหมาะสมเช่นเดียวกัน เนื่องจากการฆ่าเชื้อโดยการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อมีข้อจำกัดทางด้านโครงสร้างของรถเข็นเช่นเดียวกันกับการใช้น้ำร้อนฆ่าเชื้อ อีกทั้ง ทางผู้ผลิตมีการดำเนินการภายใต้ระบบการจัดการสิ่งแวดล้อม (ISO 14001 : 2015) และระบบการจัดการอาชีวอนามัยและความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน (OHSAS 18001 : 2007) ดังนั้น การใช้สารเคมีในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในปริมาณที่สูงขึ้น ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มขึ้นด้วย เช่น การใช้ทรัพยากรที่สิ้นเปลืองเพิ่มขึ้น การเกิดของเสีย ได้แก่ น้ำเสีย ไอระเหยของสารเคมี และบรรจุภัณฑ์ใช้แล้วของสารเคมีที่เพิ่มมากขึ้น รวมไปถึงเมื่อพิจารณาในด้านของความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน พบว่าการเพิ่มการใช้สารเคมีมีโอกาสเกิดอุบัติเหตุในระหว่างปฏิบัติงานเพิ่มสูงขึ้น และสุดท้าย การปรับปรุงการฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำ (steam) พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการดำเนินงานของผู้ผลิต โดยเมื่อเปรียบเทียบการพลังงานกับระหว่างการใช้ไอน้ำและการใช้น้ำร้อน พบว่า มีการใช้พลังงานในการผลิตไอน้ำน้อยกว่าการผลิตน้ำร้อน เนื่องจาก มีการเปิดตู้นึ่งไอน้ำ (box steamer) เฉพาะในเวลาที่ต้องการฆ่าเชื้อพื้นผิวอุปกรณ์เท่านั้น ดังนั้น จึงสามารถควบคุมเวลาในการเปิดใช้ไอน้ำได้ ต่างกับการฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนที่มีความจำเป็นต้องต้มน้ำให้ร้อนตลอดเวลา และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. coli* พบว่า การฆ่าเชื้อพื้นผิวอุปกรณ์ด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำ (box steamer) สามารถควบคุมระยะเวลาในการสัมผัสความร้อนกับพื้นผิวรถเข็นได้ รวมทั้งสามารถฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของรถเข็นได้อย่างทั่วถึง โดยไม่ติดข้อจำกัดในเรื่องโครงสร้างของรถเข็น รวมไปถึง สามารถลดโอกาสการเกิดอุบัติเหตุ ลดการเพิ่มค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีทำความสะอาด ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค พบว่า การฆ่าเชื้อพื้นผิวอุปกรณ์ด้วยไอน้ำ มีข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ คือ ไม่มีสารเคมีตกค้างบนพื้นผิวอุปกรณ์และไม่กัดกร่อนพื้นผิวอุปกรณ์ (Marriott, 1997) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการพิจารณาใช้เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวของรถเข็น

ในปัจจุบันทางผู้ผลิตได้นำชิ้นส่วนเครื่องจักรหลังล้างทำความสะอาดบางชนิดที่มีลักษณะทางโครงสร้างไม่เหมาะสมกับการนำไปแช่ฆ่าเชื้อในน้ำร้อน เช่น ตะแกรงที่ใช้ในเครื่องร่อนแป้ง ไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยตู้นึ่งไอน้ำ โดยใช้อุณหภูมิไอน้ำที่ 95°C เป็นระยะเวลา 120 วินาที จากผลการตรวจสอบหลังการฆ่าเชื้อที่ผ่านมา พบว่า สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงนำมาใช้ประยุกต์ในการฆ่าเชื้อรถเข็นต่อไป

4.6 ผลของไอน้ำต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ เพื่อกำหนดเป็นวิธีการปฏิบัติงานในการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวของรถเข็นที่พบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* อย่างมีประสิทธิภาพ และลดการใช้พลังงานของโรงงาน โดยนำรถเข็นหลังใช้งานมาล้างทำความสะอาดคราบสกปรกด้วยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน (ขัดถูรถเข็นด้วยฟองน้ำชุบน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และล้างออกด้วยน้ำสะอาด) จากนั้นนำรถเข็นไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำ (Box steamer) ดังภาพที่ 4.9 พิจารณาใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) โดยฆ่าเชื้อรถเข็นที่อุณหภูมิ 85, 90 และ 95°C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ จากนั้นทำการสวอปรถเข็นหลังก่อนและหลังการฆ่าเชื้อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli,* coliforms และจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ในรถเข็นตามเกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเพื่อควบคุมคุณภาพภายในโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออก ได้ผลดังตารางที่ 4.7, 4.8 และ 4.9

ภาพที่ 4.8 การฆ่าเชื้อรถเข็นโดยการใช้ไอน้ำจากตู้นึ่งไอน้ำ (box steamer)

ตารางที่ 4.7 ผลของอุณหภูมิและเวลาโดยการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในรถเข็น

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดรถเข็น	อุณหภูมิที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น	ระยะเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น (วินาที)	จำนวนครั้งในการทดลอง	จำนวนสวอปที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli*	จำนวนสวอปที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli*
1) รถเข็นก่อนล้างด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2	อุณหภูมิห้อง	-	3	2	1
2) รถเข็นหลังล้างด้วยน้ำสะอาด (ก่อนฆ่าเชื้อ)	อุณหภูมิห้อง	-	3	3	0
3) รถเข็นหลังฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ					
3.1) ที่ 85 °C, 60 วินาที	85 °C	60	3	0	3
3.2) ที่ 85 °C, 90 วินาที	85 °C	90	3	0	3
3.3) ที่ 85 °C, 120 วินาที	85 °C	120	3	0	3
3.4) ที่ 90 °C, 60 วินาที	90 °C	60	3	0	3
3.5) ที่ 90 °C, 90 วินาที	90 °C	90	3	0	3
3.6) ที่ 90 °C, 120 วินาที	90 °C	120	3	0	3
3.7) ที่ 95 °C, 60 วินาที	95 °C	60	3	0	3
3.8) ที่ 95 °C, 90 วินาที	95 °C	90	3	0	3
3.9) ที่ 95 °C, 120 วินาที	95 °C	120	3	0	3

ตารางที่ 4.8 ผลของอุณหภูมิและเวลาโดยการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ในรถเข็น

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดรถเข็น	อุณหภูมิที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น	ระยะเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น (วินาที)	จำนวนครั้งในการทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (cfu/100 ตารางเซนติเมตร)			
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1) รถเข็นก่อนล้างด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2	อุณหภูมิห้อง		3	1000	1000	1000	1000.00±0.000[a]
2) รถเข็นหลังล้างด้วยน้ำสะอาด (ก่อนฆ่าเชื้อ)	อุณหภูมิห้อง		3	1000	1000	1000	1000.00±0.000[a]
3) รถเข็นหลังฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ							
3.1) ที่ 85 °C, 60 วินาที	85 °C	60	3	0	0	11	3.67±6.351[b]
3.2) ที่ 85 °C, 90 วินาที	85 °C	90	3	0	0	0	0.00±0.000[b]
3.3) ที่ 85 °C, 120 วินาที	85 °C	120	3	0	0	0	0.67±1.155[b]
3.4) ที่ 90 °C, 60 วินาที	90 °C	60	3	0	0	1	3.33±5.774[b]
3.5) ที่ 90 °C, 90 วินาที	90 °C	90	3	0	1	0	0.33±0.577[b]
3.6) ที่ 90 °C, 120 วินาที	90 °C	120	3	10	0	0	3.33±5.774[b]
3.7) ที่ 95 °C, 60 วินาที	95 °C	60	3	1	1	0	0.67±0.577[b]
3.8) ที่ 95 °C, 90 วินาที	95 °C	90	3	0	2	0	0.67±1.155[b]
3.9) ที่ 95 °C, 120 วินาที	95 °C	120	3	0	0	0	0.00±0.000[b]

หมายเหตุ :

- ขีดจำกัดการตรวจหา (limit of detection) ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด < 1 cfu/100 ตารางเซนติเมตร

- ตัวอักษร a และ b ในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.9 ผลของอุณหภูมิและเวลาโดยการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำโดยใช้ตู้นึ่งไอน้ำในการลดการปนเปื้อนเชื้อ coliforms ในรถเข็น

ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดรถเข็น	อุณหภูมิที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น	ระยะเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อรถเข็น (วินาที)	จำนวนครั้งในการทดลอง	จำนวนเชื้อ coliforms (cfu/100 ตารางเซนติเมตร)			
				ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1) รถเข็นก่อนล้างด้วยน้ำสบู่ความเข้มข้นร้อยละ 2	อุณหภูมิห้อง		3	1000	1000	9	669.67±572.15[a]
2) รถเข็นหลังล้างด้วยน้ำสะอาด (ก่อนฆ่าเชื้อ)	อุณหภูมิห้อง		3	35	1000	236	423.67±509.14[ab]
3) รถเข็นหลังฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ							
3.1) ที่ 85 °C, 60 วินาที	85 °C	60	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.2) ที่ 85 °C, 90 วินาที	85 °C	90	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.3) ที่ 85 °C, 120 วินาที	85 °C	120	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.4) ที่ 90 °C, 60 วินาที	90 °C	60	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.5) ที่ 90 °C, 90 วินาที	90 °C	90	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.6) ที่ 90 °C, 120 วินาที	90 °C	120	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.7) ที่ 95 °C, 60 วินาที	95 °C	60	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.8) ที่ 95 °C, 90 วินาที	95 °C	90	3	0	0	0	0.00±0.00[b]
3.9) ที่ 95 °C, 120 วินาที	95 °C	120	3	0	0	0	0.00±0.00[b]

หมายเหตุ :

- ขีดจำกัดการตรวจหา (limit of detection) ของวิธีทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด < 1 cfu/100 ตารางเซนติเมตร (0 มีค่า < 1)

- ตัวอักษร a และ b ในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.7 ผลการตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็นในทุกตัวอย่างที่มีการสวอป ทั้งแบบที่ 1 รถเข็นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 85 °C ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ 60, 90 และ 120 วินาที แบบที่ 2 รถเข็นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 90 °C ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ 60, 90 และ 120 วินาที และแบบที่ 3 รถเข็นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 95 °C ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ 60, 90 และ 120 วินาที และผลการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และ coliforms หลังผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำทั้ง 3 แบบ (ตารางที่ 4.8 และ 4.9) พบว่า อยู่ในช่วง < 1 ถึง 11 cfu/100 ตารางเซนติเมตร และ < 1 cfu/100 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดตามเกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต เพื่อควบคุมคุณภาพภายในโรงงานผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งส่งออก (ตารางที่ 2.8) แสดงให้เห็นว่า สภาวะของการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิและเวลาทั้ง 3 แบบ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* รวมไปถึงจุลินทรีย์ทั้งหมด และ coliforms บนพื้นผิวรถเข็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากไอน้ำเป็นความร้อนชื้น (moist heat) ประเภทหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป รวมทั้ง เชื้อ *E. coli* โดยผลของความร้อนจากไอน้ำทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงสภาพ ทำให้เกิดการแข็งตัวและตกตะกอนของโปรตีน (protein coagulation) ภายในเซลล์ เกิดการแตกหักและสลายตัวของสารพันธุกรรมทั้งกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) และกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic Acid, DNA) รวมไปถึงทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายและตายในที่สุด (Block, 2001) ดังนั้น สามารถเลือกใช้การฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวของรถเข็นได้ โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาน้อยที่สุด คือ ใช้อุณหภูมิ 85 °C เป็นระยะเวลา 60 วินาทีในการฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับรายงานของ Food safety and inspection service (2002) ซึ่งได้แนะนำวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบริเวณซากเนื้อโคหลังจากการผ่าขึ้นซาก โดยการใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรซ์ในการฆ่าเชื้อ (steam pasteurization) และใช้เวลาในการฆ่าเชื้อไม่ต่ำกว่า 30 วินาที โดยพบว่า วิธีดังกล่าว มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการลดการปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวตัวซาก ซึ่งเป็นลักษณะการปนเปื้อนรูปแบบคล้ายกันเชื้อ *E.coli* ที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวรถเข็น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งและพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต ตั้งแต่ขั้นตอนหลังการปรุงสุกจนถึงการทำเยือกแข็งของโรงงานผลิตอาหารพร้อมปรุงเพื่อส่งออกต่างประเทศแห่งหนึ่ง ที่มีการดำเนินการผลิตภายใต้หลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices: GMP) และมีระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ผลการตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งในทุกขั้นตอนการผลิต ในส่วนของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตบริเวณพื้นที่หลังการปรุงสุก (post-heating area) แบ่งออกเป็น 3 โซน ได้แก่ โซนที่ 1 พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์โดยตรง ถัดมาเป็นโซนที่ 2 พื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง และโซนที่ 3 พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์ จากการตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซนที่ 1 ยังคงพบการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซนที่ 2 ได้แก่ รถเข็น และ โซนที่ 3 ได้แก่ พื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลว จึงได้นำเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบทั้ง 2 บริเวณไปตรวจสอบสายพันธุ์โดยวิธี phylogenetic group เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ของทั้ง 2 บริเวณและหาแนวทางแก้ไข

เมื่อนำเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในรถเข็นและในพื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลวไปตรวจสอบสายพันธุ์โดยวิธี phylogenetic group โดยใช้ยีน (gene) 2 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *chuA* และ *yjaA* และใช้ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (DNA fragment) ที่เรียกว่า TSPE4.C2 เปรียบเทียบเชื้อ *E. coli* ที่ทราบสายพันธุ์ ผลการตรวจสอบพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่มาจากทั้ง 2 โซน เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันโดยจัดอยู่ใน phylogroup A ซึ่งไม่ใช่เชื้อ *E. coli* ก่อโรค (serotype 0157:H7) ซึ่งจัดอยู่ใน phylogroup D จากการศึกษา พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* จากรถเข็นหลังล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโดยการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 82°C ราดบริเวณพื้นผิวรถเข็น ทำให้ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในพื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลวจากนั้นเกิดการปนเปื้อนข้ามจากรถเข็นไปยังถังบรรจุน้ำแป้งเหลวและมีโอกาสปนเปื้อนข้ามไปสู่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในที่สุด

การศึกษาผลของไอน้ำต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในรถเข็นที่ใช้ในกระบวนการผลิต เป็นการปรับปรุงในขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากล้างทำความสะอาดรถเข็น ให้มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นผิวของรถเข็น โดยพบว่า การให้ความร้อนไอน้ำที่อุณหภูมิ 85, 90 และ 95°C เป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน โดยตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* เหลือรอดบนพื้นผิวของรถเข็นหลังฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำในทุกการทดลอง ซึ่งจากการทดลองพบว่า ในการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิไม่น้อยกว่า 85°C ที่ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 60 วินาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากใช้พลังงานความร้อนน้อยที่สุดและใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อน้อยที่สุด มีผลกระทบต่อต้นทุนในการผลิตของผู้ผลิตต่ำที่สุด สามารถสรุปได้ว่าการใช้ไอน้ำร้อนในขั้นตอนการฆ่าเชื้อหลังจากล้างทำความสะอาดรถเข็น สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E.coli* บนพื้นผิวรถเข็นที่ใช้ขนถ่ายส่วนผสมในกระบวนการผลิตเนื้อสุกรปรุงสุกแช่เยือกแข็งได้ จะสามารถลดโอกาสการปนเปื้อนข้ามจากรถเข็นไปสู่ผลิตภัณฑ์ได้ และลดความเสี่ยงที่ผู้บริโภคได้รับอันตรายจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* เข้าไป รวมไปถึง ลดการสูญเสียรายได้จากการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ของผู้ผลิตและเป็นแนวทางการติดตามการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆในโรงงานได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การแบ่งพื้นที่เป็นโซนของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไปสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทอาจมีระดับความเสียงที่แตกต่างกัน ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทมีความจำเป็นในการกำหนดและจัดโซนของแต่ละโรงงาน

2. การเลือกใช้วิธีการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในโรงงานผลิตอาหาร ควรพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องร่วมด้วย เช่น ต้นทุนในการผลิตสินค้า การสูญเสียเวลาในการผลิตสินค้า รวมไปถึง ระบบการจัดการด้านอื่นๆ ภายใต้การดำเนินงานของโรงงาน เช่น ระบบการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม ระบบการจัดการด้านพลังงาน หรือ ระบบการจัดการด้านอาชีวอนามัยและความปลอดภัย เป็นต้น

3. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในระดับสายพันธุ์โดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น phylogenetic group สามารถใช้เป็นแนวทางการติดตามแหล่งของการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ ในโรงงานได้

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์. 2551. **ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่องเกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://qcontrol.dld.go.th/images /law /regulation / MicrobiologicalSTDforLivestockProducts.PDF. วันที่เข้าถึง 1 ตุลาคม 2560.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2560. **เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหารประเภทพื้นผิวสัมผัส.** ฉบับที่ 3. กรุงเทพฯ : พีทูดีไซน์ แอนด์ พริ้นท์.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2557. ***Escherichia coli***. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/12_57.pdf. วันที่เข้าถึง 20 มิถุนายน 2562.

จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์. 2554. **บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน โรคอุจจาระร่วงจากเชื้ออีโคไล**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0052.pdf. วันที่เข้าถึง 1 ตุลาคม 2560.

บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด. 2550. **คู่มือการแปลผล 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates**. กรุงเทพฯ : บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด.

บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด. 2550. **คู่มือการแปลผล 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates**. กรุงเทพฯ : บริษัท 3เอ็ม ประเทศไทย จำกัด.

ปภาสพงษ์ จงชานสิทโธ และสุภลักษณ์ ตันประยูร. 2556. **การปนเปื้อนของปริมาณเชื้อก่อโรคที่พบในเนื้อสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์และสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ในจังหวัดแม่ฮ่องสอนระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://pvlomhs.dld.go.th/pic 62/56(2)-0116(5)-153.pdf. วันที่เข้าถึง 1 ตุลาคม 2560.

มณฑล เลิศวรปรีชา และชัยสิทธิ์ นิยะสม. 2554. **Eenterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC):พยาธิกำเนิดและระบาดวิทยา**. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 14(2) : 109-117.

วฤษณี ปรีชานฤชิตกุล. 2554. สิ่งเล็กๆที่เรียกว่าอีโคไล. **น.ส.พ.กสิกร** 84(4) : 77 – 82.

วรรณพร ศรีสุคนธรัตน์. 2558. **สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.

วรวุฒิ เจริญศิริ. 2554. **โรคติดเชื้อแบคทีเรียอีโคไล O104**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.bangkokhealth.com/health/article/%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%94%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B9%81%E0%B8%9A%E0%B8%84%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%80%E0%B8%A3%E0%B8%B5%E0%B8%A2%E0%B8%AD%E0%B8%B5%E0%B9%82%E0%B8%84%E0%B9%84%E0%B8%A5-O104-766. วันที่เข้าถึง 3 พฤศจิกายน 2560.

สุวิมล กีรติพิบูล. 2559. **GMP (Good manufacturing practice)**. [slide]. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย. 2558. **อาหารแช่เยือกแข็ง**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.foodsafety.moph.go.th/th/news-nationaldetail.php?id=378&pcid=270&pcpage=192. วันที่เข้าถึง 1 ตุลาคม 2560.

สมาคมผู้ผลิตและแปรรูปสุกรเพื่อการส่งออก. 2558. **ทิศทางการพัฒนาปศุสัตว์ไทยในอนาคต**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaiswine.org. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2560.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2559. **ส่งออกอาหารแปรรูปไทยสร้างรายได้ติดอันดับโลก**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.kasikornbank.com/TH/SME/KSMEKnowledge/KSMEAnalysis/Documents/ExpotProcessedFood.pdf. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2560.

Aamir, A. 2013. **The people of Karachi: Everyone has a story**. [online]. Available : https://blogs.tribune.com.pk/story/18718/the-people-of-karachi-everyone-has-a-story/. Verified 25 June 2019.

Ali, N.H., A. Farooqui, A. Khan, A.Y. Khan and S.U. Kazmi. 2010. Microbial contamination of raw meat and its environment in retail shops in Karachi, Pakistan. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 4(6) : 382-388.

Ashbolt, N.J., W.O.K. Grabow, and M. Snozzi. 2001. **Water Quality: Guidelines, Standards and Health** . London : IWA Publishing.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. **AOAC Official Method 990.12 Aerobic Plate Count in Foods Dry Rehydrate film (Petrifilm™ Aerobic Count Plate) Method**. [online]. Available : https://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-990.12.pdf. Verified 20 July 2019.

Association of Official Analytical Chemists. 1991. **AOAC Official Method 991.14 Coliform and *Escherichia coli* Count in Foods Dry Rehydrate film (Petrifilm™ *E. coli*/Coliform Count Plate™ and Petrifilm™ Coliform Count Plate™) Methods**. [online]. Available : http://www.edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-991.14.pdf. Verified 20 July 2019.

Block, S.S. 1991. **Disinfection Sterilization and Preservation**. 4th edition. USA : Williams & Wilkins.

Block, S.S. 2001. **Disinfection Sterilization and Preservation**. 5th edition. USA : Williams & Wilkins.

Carlos, C., M.M. Pires, N.C. Stoppe, E.M. Hachich, M.I. Sato, T.A. Gomes, L.A. Amaral, and L.M. Ottoboni. 2010. **"***Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination." **BMC Micro biology**. Volume 10. USA : Springer Nature.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2014. **Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)**. [online]. Available https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html. Verified 20 June 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. ***E. coli* Homepage/symptoms**. [online]. Available : https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html. Verified 25 June 2019.

Ciara, E., O.Reilly, M. Iwamoto and P.M. Griffin. 2014**.** ***Escherichia coli*, Diarrheagenic**. [online]. Available : https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/escherichia-coli-diarrheagenic. Verified 25 June 2019.

Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group**. Applied and Environment Microbiology**. 66 : 4555 -4558.

Environmental protection agency. 2002. **Wastewater Technology Fact Sheet Bacterial Source Tracking**. [online]. Available : https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P10099QB.PDF?Dockey=P10099QB.PDF. Verified 25 October 2017.

Feng, P., S. D. Weagant, M. A. Grant and W. Burkhardt. 2002. **BAM 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**. [online]. Available : https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria. Verified 20 July 2019.

Food safety and inspection service. 2002. **Guidance for minimizing the risk of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* in beef slaughter operations.** [online]. Available : http://haccpalliance.org/alliance/BeefSlauterGuide.pdf. Verified 18 June 2019.

Food Safety Authority of Ireland. 2018**. An investigation of the most appropriate z-value to be used in calculating ‘ equivalent cooks’ for beef burgers in food business establishments.** Ireland : Food Safety Authority of Ireland.

Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 12th edition. USA : Elsevier.

Fraser, A.M. 2003. **Cleaning and sanitizing**. [online]. Available : https://chinese foodsafety.com /sections/pdf/section11b_clean.pdf. Verified 22 June 2019.

Garrity, G., D.J. Brenner, N.R. Krieng, and J.R. Staley. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Volume 2. 2nd edtion. USA : Springer.

Honish, L., N. Punja, S. Nunn, D. Nelson, N. Hislop, G. Gosselin, N. Stashko and D. Dittrich. 2017. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Contaminated Pork Products - Alberta, Canada, July–October 2014**. Morbidity and Mortality Weekly Report** . 65(52).

International organization for standardization. 2004. **ISO 18593:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs**. 1st edition. Switzerland : International organization for standardization.

Itoh, M. 2011. **Pig in Japan : the nation’s most popular meat**. [online]. Available : https://www. japantimes. co. jp/ life/ 2011/ 10/ 28/ food/ pig- in- japan- the- nations- most- popular-meat/#.WhQCz-vyjIU. Verified 21 November 2017.

Japan Experience. 2017**. Tonkatsu**. [online]. Available : https://www.japanexperience.com/to-know/chopsticks-at-the-ready/tonkatsu. Verified 22 November 2017.

Japan external trade organization. 2011. **Specifications and standards for Foods, Food additives, etc. under the food sanitation act (Abstracts) 2010**. Japan : Japan external trade organization.

Keeratipibul, S. and P. Techaruwichit. 2012. Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. **Food Control**. 27 : 64 - 72.

Larsen, L. 2017. **Four Arizona Children Sickened with *E. coli O157***. [online]. Available : https://foodpoisoningbulletin.com/2017/four-arizona-children-sickened-with-e-coli-o157/. Verified 3 November 2017.

Lawley, R. 2013. ***Escherichia coli***. [online]. Available : http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/escherichia-coli/. Verified 2 November 2017.

Marler, B. 2013. **Publisher's Platform: "Ready to Cook" Frozen Meals With *E. coli* Can Be Very, Very Dangerous**. [online]. Available : http://www.foodsafetynews.com/2013/04/publishers-platform-ready-to-cook-frozen-meals-with-e-coli-can-beveryverydangerous /#.WfcFpu vyjIU. Verified 3 November 2017.

Marriott, N.G. 1997. **Essentials of foods sanitation**. USA : Chapman & Hall.

Ministry for primary industry New Zealand. 2001. ***Escherichia coli* O157: H7**. [online]. Available : http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Escherichia_Coli- Organism_Invades.pdf. Verified 13 October 2017.

Ministry for primary industry New Zealand. 2015**. Standardizing D and Z values for cooking raw meat.** [online]. Available : http: / / www. foodsafety. govt. nz/ elibrary/ industry/ Escherichia _Coli-Organism_Invades.pdf. Verified 3 November 2017.

Pavlickova, S., A. Klancnik, M. Dolezalova, S.M. Mozina, and I. Holko. 2017. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. **Journal of Environmental Science and Health**. 8 : 570-576.

Ross, R. 2016. **Getting Clean: The Science of Soap**. [online]. Available : https://www.livescience.com/57044-science-of-soap.html. Verified 22 June 2019.

Schlegelova, J., V. Babak, M. Holasova, L. Konstantinova, L. necidova, F. Sisak, H. Vlkova, P. roubal and Z. Jaglic. 2010. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in daily and meat processing plants. **Czech Journal of Food Sciences**. 28 : 450 -461.

Smati, M., O. Clermont, F.L. Gal, O. Schichmanoff, F. Jaureguy, A. Eddi, E. Denamur and B. Picard. 2013. Real-Time PCR for Quantitative Analysis of Human Commensal *Escherichia coli* Populations Reveals a High Frequency of Subdominant Phylogroups. **Applied and Environmental Microbiology**. 79(16) : 5005–5012.

Stringer, S.C., S.M. George, and M.W. Peck. 2000. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. 88 : 79 – 89.

The Reference Laboratory for *Escherichia coli*. 2004. **Pathogenic *E. coli***. [online]. Available : http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp. Verified 1 October 2017.

Todar, K. 2008. **Pathogenic *E. coli***. [online]. Available : http://textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html. Verified 2 October 2017.

Wang, L., H. Nakmura, E. Kage-Nakadai, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2017. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. **Journal of Applied Microbiology**. 122 : 267 – 278.

World Health Organization (WHO). 1996. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in Japan-Update**. [online]. Available : http://www.who.int/csr/don/1996_08_28/en/. Verified 1 October 2017.

World Health Organization (WHO). 2017. ***E. coli* fact sheet**. [online]. Available : http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/. Verified 1 October 2017.

World Health Organization (WHO). 2018. ***E. coli*** [online]. Available : https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli. Verified 28 June 2019.

Yang, X., A. He, M. Badoni, F. Tran, and H. Wang. 2017. Mapping sources of contamination of *Escherichia coli* on beef in the fabrication facility of a commercial beef packing plant. **Food Control**. 75 : 153 – 159.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองและวิธีการเตรียม

ก.1.1 Butterfield' s buffered phosphate diluent (BPB)

ส่วนผสม

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ยี่ห้อ Merck 34 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 34 กรัม จากนั้น นำไปละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ค่า pH 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (N) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ที่เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จัดเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2- 8 °C

ก.1.2 *Escherichia coli* broth (EC broth)

ส่วนผสม

Escherichia coli broth (EC broth) ยี่ห้อ TM media 37 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง EC broth จำนวน 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปรับค่า pH 6.9 $\pm$ 0.2 จากนั้นบรรจุลงหลอดทดลอง ปริมาตร 10 หรือ 17 มิลลิลิตร ที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ด้านใน นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ที่เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ก.1.3 Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

ส่วนผสม

Eosin Methylene Blue Agar (EMB) ยี่ห้อ Oxoid	37.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Eosin Methylene Blue Agar จำนวน 37.5 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปรับค่า pH 6.8 $\pm$ 0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ที่เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เทลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 15-20 มิลลิลิตร จัดเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2- 8 ^{o}C

ก.1.4 Lactose broth

ส่วนผสม

Lactose broth ยี่ห้อ Oxoid	13 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Lactose broth จำนวน 13 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปรับค่า pH 6.9 $\pm$ 0.2 จากนั้นบรรจุลงหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ใส่หลอดดักแก๊ส ไว้ด้านในนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ที่เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ก.1.5 Peptone ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ส่วนผสม

Peptone ยี่ห้อ Oxoid	1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Peptone จำนวน 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ปรับค่า pH 7.0 $\pm$ 0.2 ถ่ายใส่ภาชนะที่เหมาะสม จากนั้น นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ที่เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ก.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองและวิธีการเตรียม

ก.2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (N)

ส่วนผสม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ Merck	4 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 4 กรัม จากนั้นนำไปละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ถ่ายสารละลายใส่ขวดสีชา และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ก.2.2 กรดไฮโดรคลอลิคความเข้มข้น 1 นอร์มัล (N)

ส่วนผสม

กรดไฮโดรคลอลิค (HCl) ยี่ห้อ Merck	89 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	911 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

นำไฮโดรเจนคลอไรด์ปริมาณ 89 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทลงในน้ำกลั่นปริมาณ 911 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันดี ถ่ายสารละลายใส่ขวดสีชา และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบสายพันธ์เชื้อ *E.coli* แบบ phylogenetic group

ข.1 การทดสอบไพร์เมอร์ phylogenetic group

ตารางที่ ข.1 รายละเอียดนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของไพร์เมอร์ (primer)

ยีน	ไพร์เมอร์	ลำดับ (5′ ไป 3′)	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (base pair)
chuA	*chuA*-F	CGGGGGACCATAGCCTGGGATTAG	198*
	chuA-R	AACCGCTCAGAGACTGGGCTGAAT	
yjaA	*yjaA*-F	CTGCAACTCCACCCACGTTCAACC	108*
	yjaA-R	CTCAACCTGTGACAAACCGCCCTC	
TSPE4.C2	TSPE4.C2-F	GGCATTGAACGCAGGCATCCTGAA	151*
	TSPE4.C2-R	ATTGCACTCCTTGCCCTGTCATGC	
E. coli 16S	*E. coli* 16S -F	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	96**
rRNA	*E. coli* 16S -R	CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	

ที่มา: *Clermont และคณะ (2000)

** Smati และคณะ (2013)

ทำการทดสอบไพร์เมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2 และ *E. coli* 16S rRNA กับตัวอย่างดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic Acid, DNA) ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐานจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC11303 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC10536 และเชื้อ *E. coli* (O157:H7) สายพันธุ์ ATCC43888 และตัวอย่างเชื้อ *E. coli* จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อม จำนวน 26 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ *E. coli* จากรถเข็น จำนวน 8 ตัวอย่าง และ เชื้อ *E. coli* จากพื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลว จำนวน 18 ตัวอย่าง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) พบว่าได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดดังตารางที่ ข.2 จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยใช้วิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis)

จากการทดลองพบว่า ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้สอดคล้องกับที่ออกแบบในตาราง ข.1 ได้แก่ 198, 151, 108 และ 96 base pair จากผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2 และ *E.*

coli 16S rRNA ตามลำดับ โดยพบไพร์เมอร์ *E. coli* 16S rRNA มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นในทุกตัวอย่าง ในขณะที่ไพร์เมอร์ของยีน *chuA* มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นทั้งหมด 1 ตัวอย่างจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC43888 ในส่วนไพร์เมอร์ของยีน *yjaA* มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จากเชื้อ *E. coli* บนพื้นผิวรถเข็น จำนวน 8 ตัวอย่าง และจากเชื้อ *E. coli* บริเวณพื้นห้องผสมน้ำแป้งเหลวจำนวน 18 ตัวอย่าง และไพร์เมอร์ของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม TSPE4.C2 มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นทั้งหมด 1 ตัวอย่างจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC10536

ตารางที่ ข.2 สารที่ใช้และสภาวะทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

สารที่ใช้	ความเข้มข้น	สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)
PCR buffer	1X	อุณหภูมิ 94^{o}C ระยะเวลา 15 นาที
$MgCl_2$	1.6 mM	อุณหภูมิ 94^{o}C ระยะเวลา 30 วินาที
dNTP	0.2 mM	อุณหภูมิ 56^{o}C ระยะเวลา 30 วินาที (30 รอบ)
Primer-F	0.2 µM	อุณหภูมิ 72^{o}C ระยะเวลา 45 วินาที (30 รอบ)
Primer-R	0.2 µM	อุณหภูมิ 72 ^{o}C ระยะเวลา 2 นาที
Taq DNA polymerase	1 U	
DNA template	50 ng/ul	

ภาคผนวก ค

การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ coliform บนพื้นผิวรถเข็น

ค.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนพื้นผิวรถเข็น

1) นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปชุบสารละลาย peptone broth ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้น นำไม้พันสำลีไปสวอปพื้นผิวรถเข็น โดยให้มีพื้นที่สวอปไม่น้อยกว่า 100 ตารางเซนติเมตร

2) ใส่ไม้พันสำลีที่สวอปพื้นผิวรถเข็นแล้วลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ BPB diluent ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด นำไม้พันสำลีและ BPB diluent ไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เป็นระยะเวลา 30 วินาที (สามารถทำเจือจางตัวอย่างตามความเหมาะสม) จากนั้น นำไปวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates (AOAC Official 990.12, 1990)

3) วางแผ่น 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates บนพื้นราบ จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิตร ลงตรงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง โดยให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่นฟิล์ม จากนั้น ค่อยๆ ปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา (อย่าให้เกิดฟองอากาศ) รอ 1-2 นาทีเพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัวก่อนเคลื่อนย้ายแผ่นฟิล์ม

4) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{o}C$ เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง โดยให้ด้านที่เป็นเนื้อเจลอยู่ด้านล่าง โดยสามารถซ้อนแผ่นได้ไม่เกิน 20 แผ่น

5) หลังจากการบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด ทำการนับจำนวนโคโลนี โดยนับโคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีแดงทั้งหมด ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ช่วงการนับโคโลนีที่เหมาะสม คือ 30 – 300 โคโลนี (คู่มือการแปลผล 3M Petrifilm™ Aerobic Count Plates, 2007)

ค.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ coliform บนพื้นผิวรถเข็น

1) นำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปชุบสารละลาย peptone broth ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้น นำไม้พันสำลีไปสวอปพื้นผิวรถเข็น โดยให้มีพื้นที่สวอปไม่น้อยกว่า 100 ตารางเซนติเมตร

2) ใส่ไม้พันสำลีที่สวอปพื้นผิวรถเข็นแล้วลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ BPB diluent ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด นำไม้พันสำลีและ BPB diluent ไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เป็นระยะเวลา 30 วินาที (สามารถทำเจือจางตัวอย่างตามความเหมาะสม) จากนั้น นำไปวิเคราะห์หาเชื้อ coliform โดยใช้แผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates (AOAC Official 991.14, 1991)

3) วางแผ่นทดสอบ 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates (บนพื้นราบ จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิตรลงตรงกลางแผ่นฟิล์มแผ่นล่าง โดยให้ปิเปตตั้งฉากกับแผ่นฟิล์ม จากนั้น ค่อยๆ ปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงมา (อย่าให้เกิดฟองอากาศ) รอ 1-2 นาทีเพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัวก่อนเคลื่อนย้ายแผ่นฟิล์ม

4) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $35 \pm 1^{o}C$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง โดยให้ด้านที่เป็นเนื้อเจลอยู่ด้านล่าง โดยสามารถซ้อนแผ่นได้ไม่เกิน 20 แผ่น

5) หลังจากการบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด ทำการนับจำนวนโคโลนี โดยนับโคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีแดงและสีน้ำเงินที่มีฟองแก๊สทั้งหมด ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ ช่วงการนับโคโลนีที่เหมาะสม คือ 15 – 150โคโลนี (คู่มือการแปลผล 3M Petrifilm™ *E. coli*/coliform count plates, 2009)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวธิติมา กุลธีระธวัช
วัน เดือน ปีเกิด	9 มกราคม 2525 ที่กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่	152/52 ถ.โพธาราม ต.ช้างเผือก อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50300
	โทร.053-225539
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจุลชีววิทยา
	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2562	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)
	สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2546-2547	ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ บริษัท ไทยนิปปอนฟู้ดส์ จำกัด
พ.ศ. 2548-2551	ตำแหน่งผู้ช่วยหัวหน้าส่วนห้องปฏิบัติการ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ
	เบทาโกร สเปเชียลตี้ ฟู้ดส์ จำกัด
พ.ศ. 2551-2555	ตำแหน่งหัวหน้าส่วนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ
	เบทาโกร สเปเชียลตี้ ฟู้ดส์ จำกัด
พ.ศ. 2556-2558	ตำแหน่งผู้จัดการส่วนประกันคุณภาพ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ เบทาโกร
	สเปเชียลตี้ ฟู้ดส์ จำกัด
พ.ศ. 2559-2561	ตำแหน่งผู้จัดการส่วนควบคุมคุณภาพ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ เบทาโกรร
	สเปเชียลตี้ ฟู้ดส์ จำกัด
ปัจจุบัน	ตำแหน่งผู้จัดการแผนกประกันคุณภาพ บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ
	เบทาโกร สเปเชียลตี้ ฟู้ดส์ จำกัด
การนำเสนองาน	Kulteeratawat, T. 2018. Track sources of *Escherichia coli*
	contamination in a cooked pork processing plant by phylogenetic group
	technique p.175 - 180. *In* The 4th AFSA International Conference on

Food Safety and Food Security 10 – 12 August 2018 Siem Reap, Cambodia.