

การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
ของน้ำแข็งที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง

Investigation of *Staphylococcus aureus* Contamination on Ice
Served at Street Food Stalls in Latkrabang District



นายธนภัทร สีสมนตรี
นายอภิชาติ อัครวิเศษศิวะกุล

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
ของน้ำแข็งที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง

Investigation of *Staphylococcus aureus* Contamination on Ice
Served at Street Food Stalls in Latkrabang District

จัดทำโดย

นายธนภัทร สีหมนตรี 59080082

นายอภิชาติ อัครวิเศษศิริวงกุล 59080128

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

(ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

31 / พ.ค. / 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ของน้ำแข็งที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง	
ชื่อนักศึกษา	ธนภัทร สีหมนตรี	รหัสนักศึกษา 59080082
	อภิชาติ อัครวิเศษศิวะกุล	รหัสนักศึกษา 59080128
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม	
พ.ศ.	2563	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ	

บทคัดย่อ

น้ำแข็งที่ใช้ในการบริโภคต้องมีความปลอดภัยและคุณภาพระดับเดียวกับน้ำดื่มเพราะการบริโภคน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนทั้งทางตรงและทางอ้อม อาจทำให้น้ำแข็งเป็นพาหะในการนำเชื้อก่อโรคในมนุษย์ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อสำรวจและเก็บข้อมูลการจำหน่ายน้ำแข็ง ศึกษาคุณภาพทางเคมี (ความเป็นกรดต่างและค่าการนำไฟฟ้า) และคุณภาพจุลชีววิทยา (ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *Staphylococcus aureus*) ของน้ำแข็ง และใช้เทคนิคทางโมเลกุลด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์เชื้อ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และเชื้อ *S. aureus* สร้างสารพิษแอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) จากการเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจำนวน 34 ตัวอย่างที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม ร้านอาหารและน้ำแข็งในถังเก็บวัตถุดิบจากร้านอาหารในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจากแหล่งต่างๆ มีค่าเฉลี่ย 720, 539, 404 และ 4765 cfu/ml ตามลำดับและตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในน้ำแข็ง จำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 34 ตัวอย่าง พบตัวอย่างน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์ค่ามาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา ทั้งหมด 24 ตัวอย่าง (คิดเป็น 70.5%) มาจากร้านอาหารริมทาง 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 14.7%) ร้านขายเครื่องดื่ม 7 ตัวอย่าง (คิดเป็น 20.5%) ร้านอาหาร 8 ตัวอย่าง (คิดเป็น 23.5%) และถังเก็บวัตถุดิบจากร้านอาหาร 4 ตัวอย่าง (คิดเป็น 11.7%) และผลวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำแข็งจากแหล่งต่างๆ พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ จากนั้นทำการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำแข็ง พบว่าการใช้ไพรเมอร์ femA และ nucA สามารถตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของ *S. aureus* ได้ และ *S. aureus* ที่แยกได้จากน้ำแข็งไม่พบเชื้อต้านยาปฏิชีวนะเมธิซิลลิน (methicillin) และไม่สร้างสารพิษแอนเทอโรทอกซิน ผลที่ได้จากการศึกษารังนี้แสดงให้เห็น ว่าน้ำแข็งที่จำหน่ายไม่ปลอดภัยในการบริโภค

คำสำคัญ: น้ำแข็ง,ร้านอาหารริมทาง, การปนเปื้อน, สแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Investigation of <i>Staphylococcus aureus</i> Contamination on Ice Served at Street Food Stalls in Latkrabang District	
Student name	Thanapat Srihamontree	Student ID 59080082
	Apichat Aswisetsiwakul	Student ID 59080128
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology	
Year	2020	
Advisor	Assist. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert	

ABSTRACT

Ice used for consumption must be safe and follow the quality standard equivalent to drinking water. The direct and indirect contamination may allow pathogenic bacteria to transmit via ice. This research was investigation of ice sold in street-food stalls. Ice samples were evaluated chemical quality (the pH and electrical conductivity) and microbiological quality (total plate counts and *S. aureus*.) Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to classify species of the methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *S. aureus* produced enterotoxin. 34 ice samples were collected from various street-food stalls in Latkrabang district. The average total plate counts of samples from the street-food stalls, coffee shop, street-food restaurants, and their raw-ingredient containers were 720, 539, 404 and 4765 cfu/ml respectively. *S. aureus* contamination was found in 6 samples. 24 sample from 34 samples (70.5%) did not follow the quality standard: 5 samples from street-food stalls (14.7%), 7 samples from coffee shops (20.5%), 8 samples from street-food restaurants (23.5%), and 4 samples from their raw-ingredient containers (11.7%). The pH level of all samples was in the range of the quality standard. Identification of *S. aureus* isolates from ice samples using PCR technique was studied. It was found that femA and nucA primers could amplify the PCR products specific for *S. aureus* species. *S. aureus* isolates were not identified methicilin-resistant and enterotoxin strains. In conclusion, ice sold in street-food stalls in Latkrabang district was not safe for consumption.

keyword: ice, street food, contamination, *Staphylococcus aureus*

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาปัญหาพิเศษในหัวข้อ “การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของน้ำแข็งที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง” ซึ่งการศึกษาปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ ซึ่งเสียสละเวลาและผลักดันให้ผู้วิจัยมีความมุ่งมั่น ในการศึกษาค้นคว้าอย่างสม่ำเสมอ ทั้งยังให้คำแนะนำ ชี้แนะ ส่งเสริมทั้งทางด้านแหล่งข้อมูลต่างๆ ด้วย ความดูแลเอาใจใส่อย่างใกล้ชิด ทั้งยังคอยตรวจทานและแนะนำข้อบกพร่องเพื่อให้การทำงานวิจัยครั้งนี้ สมบูรณ์และสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อติศร เสวตวิวัฒน์ ที่ท่านได้กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบ งานวิจัยการสนับสนุนอย่างดียิ่งในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณอัสณี วิจิตรระกะ ที่เสียสละเวลาช่วยเหลือ สนับสนุน ให้ข้อมูลต่างๆ รวมถึงการใช้ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณ วิภาวี ไยโพธิ์ทอง และ พี่ๆ นักศึกษาปริญญาโท ที่เสียสละเวลาเพื่อช่วยเหลือ ฝึกสอนผู้วิจัยและยังสนับสนุนทั้งด้านข้อมูลและช่วยเหลือให้คำปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของคณะผู้วิจัย เป็นส่วนสำคัญให้คณะผู้วิจัยประสบผลสำเร็จทางการศึกษาทุกระดับได้ทุกวันนี้ และสนับสนุนในทุกด้านและให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ร้านอาหารทุกร้านที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างน้ำแข็งภายในร้าน ให้ข้อมูล เบื้องต้น และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดีในการทำงานวิจัย

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเพื่อนๆ คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้คำแนะนำแก่คณะผู้วิจัยด้วยดีในช่วงเวลาที่กำลังศึกษา และทำงานวิจัย

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนที่ทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่า คณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้องตลอดจนผู้แต่ง หนังสือ ตำราทุกท่านที่ผู้วิจัยใช้อ้างอิงและขอมอบความกตัญญูกตเวทิตาคุณ แต่บิดา มารดา และผู้มี พระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น คณะผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และ ยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ธนภัทร สีหมนตรี

อภิชาติ อัครวิเศษศิวกุล

29 พฤษภาคม 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความรู้เกี่ยวกับร้านอาหารริมทาง	3
2.1.1 อาหารริมทาง	3
2.1.2 คู่มือข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลอาหาร สำหรับแผงลอยจำหน่ายอาหาร	3
2.2 ความรู้เกี่ยวกับน้ำแข็ง	5
2.3 คุณภาพและมาตรฐานน้ำบริโภค	6
2.4 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำแข็ง	10
2.4.1 เชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.5 หลักการพื้นฐานพีซีอาร์	12
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	16
3.1 ตัวอย่างน้ำแข็ง	16
3.2 เชื้อจุลินทรีย์	16
3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	17
3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	19
3.5.1 การสำรวจข้อมูลเบื้องต้นและสุxonามัยของตัวอย่างน้ำแข็ง	19
3.5.2 การเก็บตัวอย่างน้ำแข็ง	19
3.5.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำแข็ง	19
3.5.4 การจำแนกและระบุสายพันธุ์เชื้อ <i>S. aureus</i> ด้วยเทคนิค	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

polymerase chain reaction	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	28
4.1 ผลการสำรวจร้านอาหารริมทาง	28
4.1.1 ข้อมูลและลักษณะของร้านอาหารที่เก็บตัวอย่าง	34
4.1.2 ชนิดน้ำแข็งของร้านอาหารที่เก็บตัวอย่าง	34
4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี	37
4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์	44
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของของจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในน้ำแข็ง	45
4.5 ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในน้ำแข็ง โดยวิธีทางโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์	46
4.5.1 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง ที่สกัดโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ	46
4.5.2 ผลการศึกษาชนิดของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอ ของเชื้อ <i>S. aureus</i> โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์	47
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	53
5.1 สรุปผลการทดลอง	53
5.2 ข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	58
ภาคผนวก ก ตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และ ร้านอาหารในเขตตลาดกระบี่	59
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	62
ภาคผนวก ค ผลการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์	67

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ <i>S. aureus</i>	23
ตารางที่ 3.2	สารต่างในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i>	23
ตารางที่ 3.3	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ดื้อยา	24
ตารางที่ 3.4	สารต่างในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ดื้อยา	24
ตารางที่ 3.5	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่สร้างสารพิษ	25
ตารางที่ 3.6	สารต่างในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่สร้างสารพิษ	26
ตารางที่ 4.1	ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้าในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายอาหารริมทาง	34
ตารางที่ 4.2	ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้า ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายเครื่องดื่ม	35
ตารางที่ 4.3	ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมี การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายอาหารประเภทถั่งน้ำดื่ม	36
ตารางที่ 4.4	ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมี การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหาร ประเภทถั่งเก็บขวดดิบ	37
ตารางที่ 4.5	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ <i>S. aureus</i> ตัวอย่างน้ำแข็งในร้านอาหารริมทาง	39
ตารางที่ 4.6	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ <i>S. aureus</i> จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านขายน้ำดื่ม	40
ตารางที่ 4.7	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ <i>S. aureus</i> จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านอาหาร ประเภทถั่งน้ำดื่ม	41
ตารางที่ 4.8	ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ <i>S. aureus</i> จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านอาหาร ประเภทถั่งเก็บขวดดิบ	42
ตารางที่ 4.9	ตารางจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน เชื้อ <i>S. aureus</i> และ Total plate count ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยา	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.10 การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของดีเอ็นเอเชื้อ *S. aureus* อ่างอิง และ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็งที่พบการปนเปื้อน ที่สกัดโดย ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit)

46



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ 4.1 ลักษณะร้านอาหารริมทางที่ตั้งอยู่บริเวณริมถนน และบริเวณรอบร้านอาหาร	
(ก และ ข) ลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง ของร้าน (ค และ ง)	29
ภาพที่ 4.2 ลักษณะร้านขายเครื่องดื่ม (ก และ ข) และลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง (ค และ ง)	30
ภาพที่ 4.3 ลักษณะร้านอาหาร (ก และ ข) และลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง (ค และ ง)	31
ภาพที่ 4.4 ถังเก็บวัตถุดิบร้านอาหารและสุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน (ก และ ข)	32
ภาพที่ 4.5 น้ำแข็งที่เก็บตัวอย่างได้จากร้านค้า (ก) ร้านขายเครื่องดื่ม ประเภทน้ำแข็งก้อนเล็ก (ข) ร้านขายอาหารประเภทถั้วถุดิบ น้ำแข็งบด (ค) ร้านอาหาร(ถั้วน้ำดื่ม) ประเภทน้ำแข็งก้อนใหญ่ (ง) ร้านขายอาหาร (ถั้วน้ำดื่ม) น้ำแข็งก้อนใหญ่ มีการแช่ขวดน้ำในถั้วน้ำแข็ง	33
ภาพที่ 4.6 สุขลักษณะของบริเวณรอบร้านอาหารริมทาง (ก) และภาชนะใส่น้ำแข็งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน (ข)	38
ภาพที่ 4.7 สุขลักษณะของบริเวณรอบร้านขายน้ำดื่ม (ก) และการใส่วัตถุดิบและวัสดุอื่น ๆ รวมกับน้ำแข็ง (ข)	40
ภาพที่ 4.8 ลักษณะของร้านอาหาร ประเภทเปิดโล่ง (ก) และ การใช้ภาชนะถั้วหรือชาม (ข) ในการตักน้ำแข็ง (ค)	42
ภาพที่ 4.9 สุขลักษณะที่ไม่ดีส่วนบุคคลของร้านอาหารประเภทถั้วน้ำดื่มและการแช่ขวดน้ำหรือวัตถุดิบรวมกับน้ำแข็ง	44
ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลทดสอบ coagulase ของ <i>S. aureus</i> ที่พบในตัวอย่าง	45
ภาพที่ 4.11 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i>	48
ภาพที่ 4.12 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ	49
ภาพที่ 4.13 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i> ที่สร้างสารพิษ	50
ภาพที่ 4.14 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>S. aureus</i> ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ	51
ภาพที่ 4.15 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>S. aureus</i> ที่สร้างสารพิษ	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

ในอุตสาหกรรมอาหารน้ำแข็งถูกใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบเครื่องดื่มและใช้เก็บรักษาอุณหภูมิของอาหาร โดยน้ำแข็งสามารถปนเปื้อนได้จากอันตรายต่างๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายหรือสารเคมีผลิตมาจากส่วนผสมที่ปนเปื้อน ถ้าในน้ำแข็งมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จะทำให้เป็นพาหะในการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปสู่ผู้บริโภคได้ องค์การอนามัยโลกได้ประกาศว่าน้ำแข็งที่จะบริโภคหรือที่สัมผัสโดยตรงกับอาหารและเครื่องดื่มจึงควรมีคุณภาพเทียบเท่ากับน้ำดื่ม (WHO, 1997) ดังนั้นหากคุณภาพน้ำที่ใช้ในการผลิตไม่ได้ถูกใช้ในการผลิตน้ำแข็งก็เป็นไปได้ว่าเครื่องดื่มและอาหารต่างๆ ที่สัมผัสกับน้ำแข็งที่ปนเปื้อนจะถูกปนเปื้อนกับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งเชืื่อนี้สามารถก่อโรคในคนได้หลายชนิด เช่น รุขุมขนอักเสบ ผื่นองบริเวณผิวหนัง การติดเชื้อหลังการผ่าตัด กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ สมอองอักเสบ ปอดบวม นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารพิษ (enterotoxin) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน เป็นต้น Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin ทนต่อสิ่งแวดล้อม อาจพบได้ที่ผิวหนัง และในโพรงจมูกของคนปกติ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางเคมีของน้ำแข็ง เพื่อตรวจสอบว่าน้ำแข็งที่มาจากแหล่งต่างๆ มีสุขอนามัยที่ดี ความปลอดภัยเพียงพอที่จะบริโภคหรือไม่ โดยทำการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *S. aureus* เพื่อทราบถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค การดื้อต่อยาและการสร้างสารพิษของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในน้ำแข็งที่มีการปนเปื้อนข้ามจากมนุษย์ และสภาพแวดล้อมที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้สามารถเป็นข้อมูลในการตระหนักถึงความเสี่ยงในการบริโภคน้ำแข็งที่จำหน่ายในทั้งอาหารริมทาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อสำรวจและเก็บข้อมูลการจำหน่ายน้ำแข็งของร้านอาหารริมทาง ร้านขาย และร้านอาหาร
- 1.2.2 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *S. aureus* ในน้ำแข็ง
- 1.2.3 เพื่อทำการแยกและระบุสายพันธุ์เชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และเชื้อสร้างสารพิษแอนเทอโรทอกซิน ด้วยวิธี Polymerase chain reaction หรือพีซีอาร์ (PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบข้อมูลการจัดการ และการเก็บรักษาน้ำแข็งของร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และร้านอาหาร

1.3.2 ทราบคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำแข็งที่จำหน่ายในร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และร้านอาหาร

1.3.3 ทราบสาเหตุและปัจจัยที่มีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในน้ำแข็ง

1.3.4 ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการแก้ไข ปรับปรุง และแนะนำผู้ประกอบการร้านอาหาร ให้มีการเก็บรักษาน้ำแข็งให้มีคุณภาพและถูกสุขลักษณะ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เกี่ยวกับร้านอาหารริมทาง

2.1.1 อาหารริมทาง (Street food)

อาหารพร้อมรับประทาน หรือเครื่องดื่มที่จำหน่ายกันริมถนนหรือที่สาธารณะ มีทั้งที่เป็น ชุ้ม ขายอาหาร รถเข็นอาหาร หรือรถบรรทุกอาหาร ทั้งนี้ส่วนใหญ่ราคาอาหารมักจะต่ำกว่าอาหารในภัตตาคาร และเป็นอาหารที่คนในท้องถิ่นนิยมรับประทาน ทำให้อาหารริมทางสะท้อนถึงวัฒนธรรมการกินในแหล่งนั้นๆ (สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม, 2560)

2.1.2 คู่มือข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลอาหาร สำหรับแผงลอยจำหน่ายอาหาร (สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ, 2560)

แผงลอยจำหน่ายอาหาร หมายถึง แคร่ แท่น โต๊ะ แผง รถเข็น หรือพาหนะอื่นใดที่ ขายอาหาร เครื่องดื่ม น้ำแข็ง โดยตั้งประจำที่ ซึ่งมีข้อกำหนดทางด้านสุขาภิบาลอาหารทั้งสิ้น 12 ข้อ โดยข้อกำหนดดังกล่าวเป็นข้อที่จำเป็น หากไม่มีอาจเกิดความเสี่ยง ทำให้อาหารมีการปนเปื้อน ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินอาหารแก่ผู้บริโภคได้ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1.2.1. แผงลอยจำหน่ายอาหารทำจากวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย มีสภาพดี เป็นระเบียบ อยู่สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 เซนติเมตร (ชม.)

บริเวณที่ใช้เตรียม บรรจุ ประกอบ และเก็บอาหารที่จำหน่ายของแผงลอยจำหน่ายอาหาร ไม่ว่าจะเป็นแคร่ แท่น โต๊ะ รถเข็น แผง ฯลฯ ต้องทำด้วยวัสดุที่ทำความสะอาดง่าย เช่น สแตนเลส อลูมิเนียม โฟมกันน้ำ ฯลฯ อยู่ในสภาพดี ไม่แตกชำรุด ไม่มีคราบสกปรก และมีการจัดวางของ เป็นระเบียบ ไม่รกรุงรังง่ายต่อการใช้งานและป้องกันการปนเปื้อนได้

2.1.2.2. อาหารปรุงสุกมีการปกปิด หรือมีการป้องกันสัตว์แมลงนำโรค

อาหารปรุงสุกแล้ว พร้อมจะบริการลูกค้า หรือที่เตรียมไว้บริการลูกค้าต้องเก็บในภาชนะที่มีฝาชี ฝาภาชนะปกปิดอาหาร หรือมีตู้ปกปิดอาหาร โดยตู้ต้องมีกระจกอย่างน้อย 3 ด้าน และด้านประตูบานเลื่อนทำด้วยลวดตาข่ายหรือตะแกรงมุ้งลวด ทั้งนี้ต้องปกปิดอาหารไว้ตลอดเวลา ยกเว้นเวลาตักอาหารจำหน่าย

2.1.2.3. สารปรุงแต่งอาหาร ต้องมีเลขสารบบอาหาร (อย.)

สารปรุงแต่งอาหาร เช่น น้ำปลา น้ำส้มสายชู ซอสปรุงรส ฯลฯ ต้องมีฉลากที่มี เลขสารบบอาหารที่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.4. น้ำดื่ม ต้องเป็นน้ำสะอาด ใส่ในภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด มีก๊อกหรือทางเทริน้ำ น้ำดื่มที่ให้บริการแก่ผู้บริโภค ควรเป็นน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วโดยการต้ม หรือกรอง เก็บในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด เช่น ขวด กาน้ำ เหยือกน้ำ หรือकुलเลอร์

2.1.2.5. เครื่องดื่ม ต้องใส่ภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด และมีที่ดักที่มีด้ามยาวหรือมีก๊อกหรือทางเทริน้ำ

เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ ที่ให้บริการแก่ลูกค้าควรบรรจุในภาชนะที่สะอาด มีการปกปิด และมีอุปกรณ์ที่มีด้ามยาวดักโดยเฉพาะ หรือใช้ภาชนะเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.4

2.1.2.6. น้ำแข็งที่ใช้บริโภค ต้องสะอาด เก็บในภาชนะที่สะอาด มีฝาปิด อยู่สูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม. ที่ดักน้ำแข็งมีด้ามยาว และต้องไม่นำอาหาร หรือสิ่งของอย่างอื่นไปแช่ไว้ในน้ำแข็ง

น้ำแข็งที่ใช้บริโภคต้องเป็นน้ำแข็งที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการบริโภคโดยตรง ไม่มีตะกอน ต้องบรรจุหรือใส่ในภาชนะที่สะอาด ไม่เป็นสนิม มีฝาปิด ต้องมีอุปกรณ์สำหรับคีบหรือดักที่มีด้ามยาวเพียงพอที่จะหยิบจับได้ โดยไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อน และในภาชนะใส่น้ำแข็งต้องไม่มีสิ่งของอื่นแช่ปนอยู่ ยกเว้นที่ดักน้ำแข็ง

2.1.2.7. ล้างภาชนะด้วยน้ำยาล้างภาชนะ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล และอุปกรณ์การล้างต้องวางสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.

ภาชนะใส่อาหารทุกประเภท ต้องล้างให้สะอาดด้วยการใช้น้ำยาล้างภาชนะทำความสะอาด ขัดถูกำจัดเศษอาหารและคราบไขมัน แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 2 ครั้ง หรือล้างด้วยน้ำไหล โดยน้ำที่ใช้ล้างจะต้องเปลี่ยนให้สะอาดอยู่เสมอ

2.1.2.8. ช้อน ส้อม ตะเกียบ วางตั้งเอาด้ามขึ้นในภาชนะโปร่งสะอาด หรือวางเป็นระเบียบ ในภาชนะโปร่งสะอาดและมีการปกปิด เก็บสูงจากพื้นอย่างน้อย 60 ซม.

ช้อน ส้อม ตะเกียบ ที่ล้างสะอาดแล้ว ต้องวางหรือเก็บในลักษณะ ดังนี้ คือ วางตั้ง ให้ส่วนที่เป็นด้ามจับไว้ด้านบน ในภาชนะที่เมื่อกวางกินไปและภาชนะ ที่ใส่ต้องโปร่งสะอาด วางเรียงนอนเป็นระเบียบไปทางเดียวกัน และควรมีผ้าหรือฝาภาชนะปิด

2.1.2.9. มีการรวบรวมมูลฝอย และเศษอาหารเพื่อนำไปกำจัด

ขยะ มูลฝอย และเศษอาหาร ที่ทิ้งจากการเตรียม ปิ้ง ประกอบ และเหลือทิ้งจากการบริโภค ต้องมีการเก็บรวบรวมโดยภาชนะที่สามารถป้องกันการกระจายของขยะ มูลฝอย เศษอาหารออกมาสู่บริเวณภายนอกและมีการนำไปกำจัดทุกวัน

2.1.2.10. ผู้สัมผัสอาหารแต่งกายสะอาด สวมเสื้อมีแขน ผู้ปรุงต้องผูกผ้ากันเปื้อนที่สะอาด สวมหมวกหรือเน็ตคลุมผม

ผู้สัมผัสอาหาร ได้แก่ ผู้ปรุง ผู้เสิร์ฟ ผู้เตรียม ผู้ล้างภาชนะ ต้องแต่งกายสะอาด และสวมเสื้อมีแขน สำหรับผู้ปรุง ต้องผูกผ้ากันเปื้อนที่สะอาด และสวมหมวกหรือเน็ตที่สามารถเก็บรวบรวมผมได้เรียบร้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.11. ใช้อุปกรณ์หยิบจับอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้ว

อาหารที่ปรุงสำเร็จ และผักสดพร้อมรับประทาน ให้หลีกเลี่ยงการใช้มือสัมผัสอาหารโดยตรง ควรใช้ช้อน ทัพพี ที่คีบ หรือควรสวมถุงมือที่สะอาด และเป็นอุปกรณ์สำหรับหยิบจับอาหารนั้นๆ โดยเฉพาะ

2.1.2.12. ผู้สัมผัสอาหารที่มีบาดแผลที่มือต้องปกปิดแผลให้มิดชิด

มือผู้สัมผัสอาหารที่มีบาดแผล ต้องปกปิดแผลให้มิดชิดโดยเฉพาะบาดแผลหรือฝีที่มีหนอง จะต้องหยุดหรือหลีกเลี่ยงการปฏิบัติงานที่มือสัมผัสกับอาหารโดยตรง

2.2 ความรู้เกี่ยวกับน้ำแข็ง

น้ำแข็งสำหรับบริโภคที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนใหญ่สามารถจำแนก ประเภทหลักๆ คือ น้ำแข็งชองและน้ำแข็งหลอด ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามร้านอาหารและร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม ซึ่งน้ำแข็ง 2 ประเภทนี้ มีลักษณะและวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน (ชัชวาล สิงห์กันต์, 2561)

2.2.1 น้ำแข็งชอง

เป็นน้ำแข็งที่ผลิตโดยกระบวนการทำน้ำให้แข็งในช่องโลหะที่แช่ในบ่อน้ำเกลือที่มีระบบทำความเย็น น้ำแข็งที่ผลิตได้จะมีลักษณะเป็นก้อนสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ มีขนาด 11 นิ้ว x 22 นิ้ว x 60 นิ้ว น้ำแข็งชองที่มีคุณภาพดีจะต้องเป็นก้อนใสสะอาด และเป็นน้ำแข็งเต็มก้อนหรือไม่มีรูภายใน ซึ่งในการจำหน่ายให้กับลูกค้าจะมีการฉีบน้ำล้างทำความสะอาดภายนอก นำไปตัดเป็นก้อน ขนาดเล็กกลงแล้วนำขึ้นรถขนส่ง หรือนำเข้าเครื่องโม่ น้ำแข็งกลายเป็น "น้ำแข็งปั่น" หรือ "น้ำแข็งบด" บรรจุลงถุงกระสอบแล้วนำขึ้นรถขนส่ง

2.2.2 น้ำแข็งหลอด

เป็นน้ำแข็งที่ผ่านกระบวนการทำน้ำให้กลายเป็นน้ำแข็ง ภายในเครื่องผลิตที่เป็นระบบปิด น้ำแข็งที่ได้จะมีลักษณะเป็นก้อนทรงกระบอก มีรูตรงกลาง มีทั้งขนาดใหญ่ (38 มิลลิเมตร) และขนาดเล็ก (19 มิลลิเมตร) ขึ้นอยู่กับแม่พิมพ์ของเครื่องผลิตน้ำแข็ง ในการจำหน่ายมีทั้งที่บรรจุลงในถุงพลาสติกปิดสนิทขนาดความจุ 1 กิโลกรัม หรือบรรจุลงถุงกระสอบขนาดความจุ 20 กิโลกรัม

จากกระบวนการผลิตน้ำแข็งทั้ง 2 ประเภท จะเห็นได้ว่า น้ำแข็งชอง โดยเฉพาะเมื่อโม่จนเป็นน้ำแข็งบด จะมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนมากกว่าน้ำแข็งหลอด เนื่องจากมีจุดที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสิ่งสกปรก และเชื้อก่อโรค เช่น ขั้นตอนการเคลื่อนย้ายน้ำแข็งก้อนจากชองไปยังเครื่องตัดหรือเครื่องบด ซึ่งมักจะไถล ก้อนน้ำแข็งไปกับพื้น หรือขั้นตอนการตัดหรือโม่ น้ำแข็งซึ่งจะมีการใช้มือสัมผัส ต่างจากกระบวนการผลิตน้ำแข็งหลอดซึ่งเป็นการผลิตในระบบปิด จึงไม่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในขั้นตอนดังกล่าว ดังนั้นน้ำแข็งบดจึงไม่เหมาะสำหรับการนำมาบริโภค แต่เหมาะกับการใช้แช่อาหารหรือวัตถุดิบอาหารมากกว่า

2.3 คุณภาพและมาตรฐานของน้ำบริโภค

คุณภาพมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 (พ.ศ.2527) ฉบับที่ 137 (พ.ศ. 2534) และ ฉบับที่ 364 (พ.ศ.2556) เรื่อง น้ำแข็ง

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 19 (พ.ศ.2522) เรื่อง กำหนดน้ำแข็ง เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน หลักเกณฑ์ เงื่อนไข และวิธีการผลิตเพื่อ จำหน่ายหรือจำหน่าย กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุ การใช้ภาชนะบรรจุ การเก็บรักษา และฉลาก ลงวันที่ 13 กันยายน พ..2522

ข้อ 2 ให้น้ำแข็งเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ

ข้อ 3 การผลิตน้ำแข็งเพื่อจำหน่ายที่มีวัตถุประสงค์ให้ใช้รับประทาน ต้องใช้น้ำสะอาดที่มี มาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) คุณสมบัติทางฟิสิกส์

- (ก) สี ต้องไม่เกิน 20 อาเซนยูนิต
- (ข) กลิ่น ต้องไม่มีกลิ่น แต่ไม่รวมถึงกลิ่นคลอรีน
- (ค) ความขุ่น ต้องไม่เกิน 5.0 ซิลิกาเซล
- (ง) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5

(2) คุณสมบัติทางเคมี

- (ก) ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solid) ไม่เกิน 500.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำ สะอาด 1 ลิตร
 - (ข) ความกระด้างทั้งหมด โดยคำนวณเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตไม่เกิน 100.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ค) สารหนูไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ง) แบริยม ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (จ) แคดเมียม ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
- ถูกยกเลิกและแทนที่โดยข้อ 1 แห่งประกาศฉบับ 137 (พ.ศ.2534)
- (จ) แคดเมียม ไม่เกิน 0.005 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ฉ) คลอไรด์ โดยคำนวณเป็นคลอรีน ไม่เกิน 250.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำ สะอาด 1 ลิตร
 - (ช) โครเมียม ไม่เกิน 005 มิลลิกรัมต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ซ) ทองแดง ไม่เกิน 1.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ฌ) เหล็ก ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร
 - (ญ) ตะกั่ว ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

ความใน (ฌ) และ (ญ) ของ (2) ถูกยกเลิกและใช้ความใหม่แทนโดยข้อ 2 แห่ง ประกาศฯ ฉบับที่ 137(พ.ศ.2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฎ) แอมโมนีเอส ไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ฉ) พรอท ไม่เกิน 0.002 มิลลิกรัมต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ฐ) ไนเตรท โดยคำนวณเป็นไนโตรเจน ไม่เกิน 4.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ฑ) ฟีนอล ไม่เกิน 0.001 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ฒ) ซีลีเนียม ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ณ) เงินไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ด) ซัลเฟต ไม่เกิน 250.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ต) สังกะสี ไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(ถ) ฟลูออไรด์ โดยคำนวณเป็นฟลูออรีน ไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

(พ) คลอรีนตกค้าง ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำสะอาด 1 ลิตร

มีความเพิ่มขึ้นเป็น (ธ) (น) และ (บ) โดยข้อ 3 แห่งประกาศฉบับที่ 137 (พ.ศ. 2534)

(3) คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์

(ก) ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number)

(ข) ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด อี.โคไล (*Escherichia coli*)

(ค) ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

ความเพิ่มขึ้น โดยข้อ 1 และ 2 แห่งประกาศ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556)

กำหนดให้อาหาร 38 ชนิดตามบัญชีหมายเลข 1 ดังต่อไปนี้ “ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ชนิดแซลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) และสแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)

ข้อ 4 น้ำแข็งตามข้อ 3 ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามมาตรฐานของน้ำสะอาดและไม่มีสิ่งหนึ่งสิ่งใดปนเปื้อนอยู่ในน้ำแข็งนั้น

ข้อ 5 กรรมวิธีการผลิตน้ำแข็งตามข้อ 3 ให้ใช้วิธีที่จะป้องกันมิให้สิ่งหนึ่งสิ่งใดที่อยู่ภายนอกเข้าไป ปนเปื้อนกับน้ำสะอาดที่ใช้ในระหว่างที่ทำการผลิต

ข้อ 6 ท่อส่งน้ำ ชองน้ำแข็ง และเครื่องใช้ในการผลิตที่สัมผัสกับน้ำสะอาดหรือน้ำแข็งจะต้องทำด้วยวัสดุที่ไม่เป็นพิษ ทนทาน และมีลักษณะที่ง่ายต่อการทำความสะอาด

ข้อ 7 พื้นผิวของท่อส่งน้ำ ชองน้ำแข็ง และเครื่องใช้ในการผลิตที่สัมผัสกับน้ำสะอาดหรือน้ำแข็งต้องสะอาด และไม่มีสิ่งหนึ่งสิ่งใดปนเปื้อนอยู่ในระหว่างที่ทำการผลิต

ข้อ 8 การผลิตน้ำแข็งเพื่อจำหน่ายที่มีวัตถุประสงค์ให้ใช้ประโยชน์อื่นนอกจากให้ใช้รับประทานต้องใช้น้ำสะอาดที่มีมาตรฐานตามข้อ 3 และจะเติมสารอื่นที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และยาเห็นชอบด้วยก็ได้ การผลิตน้ำแข็งตามวรรคหนึ่ง จะทำตามกรรมวิธีการผลิตน้ำแข็งที่กำหนดไว้ในข้อ 5 หรือทำตามกรรมวิธีการผลิตอื่นก็ได้ แต่ท่อส่งน้ำ ชองน้ำแข็ง และเครื่องใช้ในการผลิตที่สัมผัสกับน้ำ สะอาดหรือน้ำแข็ง ต้องเป็นไปตามข้อ 6 และข้อ 7

ข้อ 9 น้ำที่ใช้ในการทำความสะดวกท่อส่งน้ำ ชองน้ำแข็ง เครื่องใช้ในการผลิตที่สัมผัสกับน้ำ สะอาดหรือน้ำแข็ง และภาชนะบรรจุ ต้องใช้น้ำที่มีมาตรฐานเช่นเดียวกับน้ำที่ใช้ผลิตน้ำแข็ง การถอด น้ำแข็งออกจากชองน้ำแข็งนั้น ต้องใช้น้ำที่มีมาตรฐานเช่นเดียวกับน้ำที่ใช้ผลิตน้ำแข็ง

ข้อ 10 ในการเก็บรักษาน้ำแข็งห้ามมิให้ใช้กลบ ขี้เลื่อย กระจาบ กาบมะพร้าว เสื่อหรือ วัสดุอย่างอื่นในทำนองเดียวกันปกคลุมหรือห่อหุ้มน้ำแข็ง

ข้อ 11 สถานที่เก็บรักษาน้ำแข็งตามข้อ 3 เพื่อจำหน่ายหรือที่จำหน่าย ต้อง

- (1) สะอาดและมีระดับสูงกว่าทางเดินภายในบริเวณสถานที่เก็บรักษาน้ำแข็ง
- (2) ทำด้วยวัสดุที่ไม่เป็นพิษและเป็นวัสดุพื้นผิวเรียบรักษาความสะดวกได้ง่าย
- (3) มีลักษณะที่ง่ายต่อการทำความสะอาด และมีลักษณะปกปิดที่ป้องกันมิให้สิ่งหนึ่ง สิ่งใดจากภายนอกปนเปื้อนน้ำแข็งได้

ข้อ 12 ภาชนะบรรจุที่ใช้บรรจุน้ำแข็งตามข้อ 3 เพื่อจำหน่าย หรือที่จำหน่าย ต้อง

- (1) สะอาดและไม่มีสารออกมาปนเปื้อนกับน้ำแข็งในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อ สุขภาพ
- (2) ทำด้วยวัสดุที่ไม่เป็นพิษและเป็นวัสดุพื้นผิวเรียบรักษาความสะดวกได้ง่าย
- (3) มีลักษณะที่ง่ายต่อการทำความสะอาดและมีลักษณะปกปิดที่ป้องกันมิให้สิ่งหนึ่ง สิ่งใดจากภายนอกปนเปื้อนน้ำแข็งได้
- (4) ไม่เคยใช้บรรจุผลิตภัณฑ์อื่นนอกจากน้ำแข็ง และไม่รูปรอยประดิษฐ์หรือข้อความ ใดที่แสดงว่าเป็นภาชนะบรรจุที่ใช้บรรจุสิ่งของอื่น ในกรณีที่ใช้ยานพาหนะในลักษณะ เป็นภาชนะบรรจุด้วย ยานพาหนะที่ใช้เป็นภาชนะบรรจุนั้นจะต้องเป็นไปตาม (1) (2) และ (3)

ข้อ 13 น้ำแข็ง ตามข้อ 3 และข้อ 8 ที่ผลิตเพื่อจำหน่าย หรือที่จำหน่าย ต้องมีฉลากเป็น ภาษาไทยอ่านได้ชัดเจน ด้วยตัวอักษรขนาดไม่เล็กกว่า 5 มิลลิเมตร แสดงไว้ที่ภาชนะบรรจุและอย่างน้อย ต้องมี ข้อความ ดังต่อไปนี้

- (1) ชื่อ ที่ตั้ง ของโรงงานผลิตน้ำแข็ง
- (2) "น้ำแข็งใช้รับประทานได้" ด้วยตัวอักษรสีน้ำเงิน หรือ "น้ำแข็งใช้รับประทานไม่ได้" ด้วยตัวอักษรสีแดง แล้วแต่กรณีความในวรรคหนึ่ง มิให้ใช้บังคับแก่ภาชนะบรรจุที่ใช้ใส่น้ำแข็งเพื่อจำหน่ายโดยตรงแก่ผู้บริโภคเกณฑ์คุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และคุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์ของน้ำแข็งบริโภค แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์คุณสมบัติทางฟิสิกส์ เคมี และคุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์ของน้ำแข็งสำหรับบริโภค

คุณสมบัติ	พารามิเตอร์ที่ตรวจวิเคราะห์	หน่วย	ค่ามาตรฐาน (เกณฑ์อนุโลมสูงสุด)
คุณสมบัติทางฟิสิกส์ (Physical properties)	สี (Color)	ฮาเซน (Hazen)	20
	กลิ่น (Odor)	-	ไม่มีกลิ่น
	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	6.5-8.5
	ความขุ่น (Turbidity)	ซิลิกาสเกล (Silica scale)	5.0
คุณสมบัติทางเคมี (Chemical properties)	เอบีเอส (Alkylbenzene Sulfonate, ABS)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.2*
	อะลูมิเนียม (Aluminium, Al)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.2*
	สารหนู (Arsenic, As)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.05
	แบเรียม (Barium, Ba)	มิลลิกรัม/ลิตร	1.0
	แคดเมียม (Cadmium, Cd)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.005*
	คลอไรด์ (Chloride, Cl; คำนวณเป็นคลอไรด์)	มิลลิกรัม/ลิตร	250
	โครเมียม (Chromium, Cr)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.05
	ทองแดง (Copper, Cu)	มิลลิกรัม/ลิตร	1.0
	ไซยาไนด์ (Cyanide, CN)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.1*
	ฟลูออไรด์ (Fluoride, F; คำนวณเป็นฟลูออไรด์)	มิลลิกรัม/ลิตร	1.5
	เหล็ก (Iron, Fe)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.3*
	ตะกั่ว (Lead, Pb)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.05*
	แมงกานีส (Manganese, Mn)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.05
	ปรอท (Mercury, Hg)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.002
	ไนเตรต (Nitrate, NO ₃ -N; คำนวณเป็นไนโตรเจน)	มิลลิกรัม/ลิตร	4.0
	ฟีนอล (Phenol)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.001
	ซีลีเนียม (Selenium, Se)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.01
	เงิน (Silver, Ag)	มิลลิกรัม/ลิตร	0.05
	ซัลเฟต (Sulphate, SO ₄)	มิลลิกรัม/ลิตร	250
	ความกระด้างทั้งหมด (Total hardness; คำนวณเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต)	มิลลิกรัม/ลิตร	100
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solids; TS)	มิลลิกรัม/ลิตร	500	
สังกะสี (Zinc, Zn)	มิลลิกรัม/ลิตร	5.0	
คุณสมบัติเกี่ยวกับจุลินทรีย์ (Microorganism related properties)	แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria)	เอ็มพี.เอ็น/100 มิลลิลิตร	<2.2
	อีโคไล (<i>Escherichia coli</i>)	-	ตรวจไม่พบ
	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (Pathogens)	-	ตรวจไม่พบ**
	ซัลโมเนลลา (<i>Salmonella</i> spp.)	-	ตรวจไม่พบ***
	สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (<i>Staphylococcus aureus</i>)	-	ตรวจไม่พบ***

หมายเหตุ: ข้อมูลหลักตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 (ราชกิจจานุเบกษา, 2527)

* ข้อมูลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 137 (ราชกิจจานุเบกษา, 2534)

** ข้อมูลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 (ราชกิจจานุเบกษา, 2527) และฉบับที่ 364 (ราชกิจจานุเบกษา, 2556)

*** ข้อมูลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 (ราชกิจจานุเบกษา, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำแข็ง

2.4.1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* (ประภาวดี ดิษยาธิคม, 2524)

2.4.1.1 ลักษณะเชื้อ

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร ลักษณะการเรียงตัวอาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่มีก้อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ ไม่แน่นอน (irregular cluster) เมื่อย้อมสีแกรม เชื้อที่กำลังเจริญเติบโต และมีอายุน้อยจะติดสีม่วงเข้ม (strong gram positive) แต่หากเลี้ยงเชื้อไว้นาน เชื้อมีอายุมากขึ้น จะติดสีแดงได้ เชื้อนี้ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่บางสายพันธุ์สร้างแคปซูลได้ช่วยให้ก่อโรครุนแรงขึ้น

2.4.1.2 การเพาะเชื้อ

S. aureus เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สร้างสารสีได้ดีเมื่อเจริญในที่มืดภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ไม่สร้างสารสีเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมีลักษณะกลมมน ผิวมันวาว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 มิลลิเมตร มีสีเหลืองทอง สีเหลืองอ่อน หรือสีขาว เมื่อเจริญบน blood agar เชื้อสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ เห็นลักษณะเป็นวงใส ๆ (β -hemolysis) รอบโคโลนี ส่วน *S. epidermidis* มีโคโลนีสีขาว และมักไม่สลายเม็ดเลือดแดง จึงไม่พบ hemolysis เชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* หมักย่อยน้ำตาล หลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส แลคโตส ซูโครส และแมนนิทอล เป็นต้น *S. aureus* สามารถ หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และแมนนิทอลได้ ส่วน *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* ไม่หมักย่อย น้ำตาลแมนนิทอล จึงใช้ปฏิกิริยาหมักย่อยน้ำตาลแมนนิทอลร่วมกับคุณสมบัติอื่น ๆ เพื่อแยกชนิด ของเชื้อ *Staphylococci*

2.4.1.3 ความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม

โดยทั่วไปเชื้อ *Staphylococci* ทนทานต่อสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้าง สปอร์ด้วยกัน เชื้อทนต่อความร้อน และความแห้งแล้งได้ดี เชื้อทนต่อความร้อนสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ได้นาน ถึง 30 นาที และมีชีวิตอยู่ในที่เย็นเช่นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นานหลายเดือน นอกจากนี้ เชื้อยังทนต่อสารเคมีฆ่าเชื้อต่าง ๆ เช่น สารฟีนอล (phenol) และ เมอร์คิวรีค (mercuric chloride) เชื้อสามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ ได้ เช่น ใน 6.5 % NaCl แต่ก็มี *S. aureus* หลายสายพันธุ์ที่ต่อยาเพนิซิลลิน เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์เพนิซิลลินเนส (penicillinase) (β -lactamase) ได้

2.4.1.4 แหล่งที่พบเชื้อ

S. aureus เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูกเยื่อหูทางเดินหายใจ ทางเดินอาหารและบาดแผลที่เป็นฝีหนองรวมถึงในดินฝุ่นละออง อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่อาหารประเภทสลัดเช่น ไข่ พูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง

และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แชนวิชและผลิตภัณฑ์นม ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

2.4.1.5 การทำให้เกิดโรค

เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษแบคทีเรียในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อมีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ทำให้เกิดโรค acute infection (ฝีหนอง แผลติดเชื้อ septicemia) และ acute toxemia (heat stable enterotoxin) อาการหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1 - 6 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วงอย่างรุนแรงจนอ่อนเพลียมาก ปวดท้องและเป็นตะคริว ส่วนมากไม่มีไข้ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจซ็อกได้ อาจมีอาการอื่นแทรกซ้อนในผู้สูงอายุเด็กแรกเกิดและผู้ป่วยโรคเบาหวาน แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8 - 24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานของร่างกายและปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปในร่างกาย

2.4.1.6 การป้องกัน

1. รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ ๆ
2. หากยังไม่รับประทานในทันทีให้นำอาหารที่ปรุงสำเร็จแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว เพราะที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เชื้อจะหยุดแบ่งตัวและไม่สร้างสารพิษ
3. อุ่นอาหารให้ร้อนก่อนรับประทานทุกครั้ง
4. ไม่ควรให้ผู้ติดเชื้อ *S. aureus* บริเวณมือหรือแขน ทำหน้าที่เกี่ยวกับอาหาร

2.4.1.7 สเตปซิลโคคัส ออเรียส ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) พบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2504 เชื้อนี้คือต่อจากกลุ่ม penicillinase-resistant penicillin โดยการสร้าง penicillin binding protein 2a (PBP2a) ที่ยังคงคุณสมบัติสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน เช่นเดียวกับ PBP2 ที่พบในสายพันธุ์ที่ไวต่อยา แต่จับกับยาเมธิซิลลิน (methicillin) ได้น้อย ทำให้ยาในกลุ่ม β -lactam ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การสร้าง PBP2a ดังกล่าวกำกับ โดยยีน *mecA* MRSA ก่อโรคติดเชื้อและมีความรุนแรงไม่แตกต่างจาก *S. aureus* ที่ไวต่อยา เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในโรงพยาบาลทั่วโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 และมีอัตราการติดเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อาจ สูงถึง 30 ถึง 60 % ของ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ในระยะหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานการติดเชื้อ MRSA ในชุมชนบ้างแล้วเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยที่เคยอยู่โรงพยาบาลหรือบุคลากรการแพทย์ที่มีเชื้ออาศัยอยู่โดยไม่ก่อโรค MRSA แฝงอยู่ใน ผู้ป่วยนานหลายเดือน และสามารถแพร่กระจายไปยังบุคคลอื่นในครอบครัวได้ด้วย เชื้อ MRSA ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในชุมชนส่วนหนึ่งมักพบในเด็ก ซึ่งเชื้อ MRSA สายพันธุ์เหล่านี้ยังไวต่อยาบาง ชนิด (เช่น คลินดาไมซิน clindamycin, โคไตรโมซาโซ (co-trimoxazole) เป็นต้น ส่วนเชื้อ MRSA ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อใน

โรงพยาบาล นอกจากจะดื้อต่อยากลุ่ม β -lactam ทุกขนานแล้วยังมักดื้อต่อยากลุ่มอื่นด้วย (เช่น aminoglycosides, macrolides) การติดเชื้อ MRSA ในชุมชนในผู้ป่วยในประเทศไทยยังพบบ่อย

2.5 หลักการพื้นฐานของวิธีพีซีอาร์ (Gibthai, 2018)

เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction หรือ พีซีอาร์ (PCR) โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์ที่จะให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีน ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนหรือเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่อาศัย ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับ ดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้ คือดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide, triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, oligonucleotide อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้

2.5.1 ขั้นตอนการทำพีซีอาร์

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1) ขั้นตอน Denaturation : อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที อย่างไรก็ตามการใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันได้ไม่ดีทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ลดลงกรณีที่ดีเอ็นเอ ต้นแบบมีปริมาณ G+C content ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย

2) ขั้นตอน Primer annealing : โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 57 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิที่สูง ในขั้นตอนนี้จะช่วยในการเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ 2 นาที

3) ขั้นตอน Primer extension : เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอ ต้นแบบโดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยปกติ Taq DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนนี้แรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย จำนวนรอบในการทำพีซีอาร์ (cycle number)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็ง

ปิยะนุช จงสมัคร และคณะ (2014) การวิจัยนี้เป็นการสำรวจเชิงวิเคราะห์สถานการณ์ ความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ในน้ำแข็งสำหรับบริโภค ที่จำหน่ายในโรงอาหารและตลาดนัด มหาวิทยาลัย ศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ โดยสาเหตุการปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการผลิต การขนส่ง การเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้อง และปนเปื้อนจากผู้จำหน่ายเครื่องดื่ม การศึกษาใช้แบบตรวจร้านอาหารและแบบ ตรวจแผงลอยจำหน่ายอาหารของกองสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข และ แบบสอบถามเกี่ยวกับความรู้ เรื่องข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลของน้ำแข็งบริโภค ร่วมกับการตรวจสอบการ ปนเปื้อนจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำแข็งที่สุ่มจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม จำนวน 7 ร้านในโรงอาหาร 4 แห่ง และจากร้านจำหน่ายเครื่องดื่มในตลาดนัด จำนวน 6 ร้าน ช่วงวันที่ 1 - 30 กันยายน 2555 ผลการสำรวจ พบว่า ร้านจำหน่ายเครื่องดื่ม 9 % ได้แช่สิ่งของอื่นไว้ในถังเก็บน้ำแข็งสำหรับบริโภค และทุกร้านในตลาด นัดวางถังน้ำแข็งบนพื้นดิน ซึ่งขัดต่อข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลของน้ำแข็งบริโภค ผู้จำหน่ายเครื่องดื่มทุกราย ไม่มีการสวมถุงมืออย่างเมื่อมีการสัมผัสน้ำแข็ง ผู้จำหน่ายในโรงอาหารมีคะแนนเฉลี่ยของความรู้ในเรื่อง สุขาภิบาลและมาตรฐานน้ำแข็งบริโภคสูงถึง 94 % แต่ผู้จำหน่ายในตลาดนัดมีคะแนนเฉลี่ยเพียง 53 % ผล ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าตัวอย่างน้ำแข็งทั้งหมดไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพทางจุล ชีววิทยา โดยทุกตัวอย่างพบการปนเปื้อนโคลิฟอร์มแบคทีเรียสูงกว่ามาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณสุข กำหนด และตัวอย่างน้ำแข็ง 7 ตัวอย่าง (54 %) พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* แต่ทุกตัวอย่างไม่พบการ ปนเปื้อนของ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *Clostridium perfringens* จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า น้ำแข็งที่จำหน่ายในโรงอาหารและตลาดนัดมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ มีการปนเปื้อน จากเชื้อจุลินทรีย์สูงเกินมาตรฐานที่กำหนด ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นผลการศึกษาเบื้องต้น เพื่อให้ทราบ สถานการณ์ความปลอดภัยของน้ำแข็งในชุมชนมหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ และใช้เป็น แนวทางในการปรับปรุงการบริหาร จัดการน้ำแข็งในมหาวิทยาลัย ให้เกิดความปลอดภัยกับผู้บริโภค นำผล การตรวจสอบแจ้งให้ผู้ประกอบการทราบ และกำหนดมาตรการปฏิบัติที่ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะที่ดี เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแข็งที่มีการจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

อนุสรณ์ เป้าสูงเนิน และคณะ (2017) วิจัยเชิงพรรณนาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการ ปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำแข็งและสภาพสุขาภิบาลร้านค้าขายปลีกและร้านขายเครื่องดื่ม บริเวณด้านหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา กลุ่มตัวอย่าง คือ น้ำแข็งจากร้านค้าขายปลีกและร้าน ขายเครื่องดื่ม บริเวณด้านหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา จำนวน 33 ร้าน ร้านละ 1 ตัวอย่าง ดำเนินการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบอย่างง่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำรวจสภาพสุขาภิบาล วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวน % และใช้สถิติเชิงอนุมาน ในการหาความสัมพันธ์ ระหว่างสภาพสุขาภิบาลกับการปนเปื้อนโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยใช้สถิติไคสแควร์ ผลการศึกษา พบว่า ผล การประเมินตามเกณฑ์มาตรฐานสุขาภิบาล ร้านค้าขายปลีก ผ่าน มาตรฐานดีมาก 6 ร้าน (18.18 %) ผ่าน มาตรฐานดี 11 ร้าน (33.33 %) ร้านขายเครื่องดื่ม ผ่านมาตรฐานดีมาก 4 ร้าน (12.12 %) ผ่านมาตรฐานดี

เอกสารงานเอกสารที่ส่งมอบให้เพื่อใช้ในการเรียนการสอน เมื่อผู้ดูแลเห็นแบบใช้ประโยชน์ในวิชา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12 ร้าน (36.36 %) ไม่มีร้านใดที่ไม่ผ่านมาตรฐาน พบการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียของร้านค้าขายปลีก 6 ร้าน (18.18 %) ร้านขายเครื่องดื่ม พบการปนเปื้อน 10 ร้าน (30.30 %) การปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับสภาพสุขาภิบาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$) ผลการศึกษาข้างต้นชี้ว่า น้ำแข็งสำหรับบริโภคจากร้านค้าขายปลีกและร้านขายเครื่องดื่มบางร้าน บริเวณด้านหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา มีการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ผู้ประกอบการควรมีการดำเนินการปรับปรุงด้านสภาพสุขาภิบาลที่ดี เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

Mako et al.(2014) นำตัวอย่างน้ำแข็ง 275 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ มาทำให้ละลายภายใน 24 ชั่วโมงโดยใช้แผ่นซิลิโคนมาตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดเฮเทอโรโทรฟิก (heterotrophic bacteria) การทดสอบ Colisure และ Enterolert ถูกนำมาใช้เพื่อระบุเชื้อโคลิฟอร์มและ *E. coli* และ Enterococci และใช้การกรองเมมเบรนควบคู่กับการเลี้ยงเชื้อ เพื่อตรวจหาเชื้อ *Salmonella* และ *Listeria monocytogenes* ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างน้ำแข็งที่พบในโรงงานตรวจพบระดับจุลินทรีย์ในปริมาณที่ยอมรับได้ตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านค้าปลีกและจากตู้จำหน่ายน้ำแข็งตรวจพบเชื้อ heterotrophs จำนวน 6 ที่เกินข้อกำหนด (มากกว่า 500 MPN / 100 มิลลิลิตร) น้ำแข็งจากสถานประกอบการค้าปลีกและตู้จำหน่ายอัตโนมัติ จำนวน 95 ตัวอย่าง (38 %) มีระดับความเป็นกรดต่างไม่อยู่ในช่วงที่ไม่ยอมรับ น้ำแข็งที่ผลิตในโรงงานมีคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีดีกว่าน้ำแข็งในสถานที่ค้าปลีกและจากตู้จำหน่ายน้ำแข็งแบบบริการตัวเอง

Hampikyan et al. (2017) ทำการศึกษาในตัวอย่างน้ำที่ผลิตน้ำแข็งและสถานะที่ถูกสุกลักษณะของเครื่องทำน้ำแข็งในสถานประกอบการอาหารต่างๆ ทำการเก็บตัวอย่างและนำมาตรวจเชื้อโคลิฟอร์ม (Coliforms), *E. coli*, psychrophilic bacteria และ Enterococci. จากน้ำแข็ง 75 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ในน้ำแข็ง 7 ตัวอย่าง (6.7%) และตัวอย่างกล่องใส่น้ำแข็ง 23 ตัวอย่าง (21.9 %) ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* ในตัวอย่างน้ำที่ใช้ ตรวจพบแบคทีเรียชนิด psychrophilic ในน้ำแข็ง 83 ตัวอย่าง (79.0 %) กล่องใส่น้ำแข็ง 68 ตัวอย่าง (64.7 %) ในขณะที่ Enterococci ตรวจพบในน้ำแข็ง 13 ตัวอย่าง (12.4 %) เท่านั้น ตรวจพบโคลิฟอร์มในน้ำ 13 ตัวอย่าง (12.4 %) น้ำแข็ง 71 ตัวอย่าง (67.6 %) และน้ำแข็ง 54 ตัวอย่าง (51.4 %)

2.6.2. การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus*

Mehrotha et al. (2000) ทำการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ แบบมัลติเพล็กซ์สำหรับตรวจหายีนสร้างสารพิษ staphylococcal enterotoxins A ถึง E (entA, entB, entC, entD, และ entE), พิษช็อคภาวะพิษ 1 (tst), สารพิษ exfoliative toxins A และ B (etaA และ etaB) และความต้านทานยาเมธิซิลลิน (mecA) โดยการใช้การตรวจหา femA เป็นการควบคุมเชิงบวก การทดสอบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ได้รวมไพรเมอร์ SEA, SEB, SEC, SED และ femA ในชุดเดียว และชุดสำหรับ eta, etb, tst, mecA และ femA ในอีกชุดหนึ่ง การตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้เชื้อ *S. aureus* 176 ตัวอย่าง การทดสอบนี้นำเสนอทางเลือกที่พิเศษรวดเร็วเชื่อถือได้และราคาไม่แพงสำหรับการตรวจพีซีอาร์ทั่วไปที่ใช้ในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องปฏิบัติการทางคลินิก เพื่อระบุยีน *S. aureus* ที่สร้างสารพิษต่างๆหลายชนิด รวมถึง enterotoxins พิษภาวะช็อคดาว์ซินโดรมพิษ 1 (TSST-1), exfoliative toxin (ET), hemolysins และ coagulase *S. aureus*

Normanno et al. (2007) รายงานว่า *S. aureus* ที่ทนต่อยาเมธิซิลินสายพันธุ์ (MRSA) เป็นปัญหาสุขภาพระดับโลก จากการศึกษาในปัจจุบันถือว่า *S. aureus* สายพันธุ์นั้นถูกแยกออกมาจากตัวอย่างของแหล่งกำเนิดสัตว์ในปี ค.ศ. 1634 จากการสำรวจก่อนหน้าที่ดำเนินการในอิตาลี ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2548 สายพันธุ์ที่โดดเด่นด้วยการตรวจสอบยีน *mecA* การผลิตสารพิษ staphylococcal enterotoxins (SEs) ชนิด A ถึง D และศึกษาความต้านทานของเชื้อที่มีสมบัติต่อต้านยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ นำมาตรวจสอบยีน *mecA* พบว่า 6 สายพันธุ์ (3.75 %) ให้ผลยีน *mecA* เป็นบวก ซึ่งแยกได้มาจากตัวอย่างนมวัว 4 ตัวอย่าง และสองตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์นม เชื้อ MRSA ที่แยกได้ ตรวจพบการสร้างสารพิษชนิด A (SEA) 2 สายพันธุ์ ชนิด C (SEC) 1 สายพันธุ์ และ ชนิด D (SED) 2 สายพันธุ์ และทุกสายพันธุ์มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดที่ทดสอบ แต่ไม่มีตัวไหนทนต่อไกลโคเปปไทด์ (glycopeptides)

Wongboot et al. (2013) รายงานว่าเชื้อ Methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) และเชื้อ *S. aureus* สร้างสารพิษแอนโทโรท็อกซิน เป็นเชื้อโรคที่พบได้ทั่วไปในมนุษย์ซึ่งสามารถสร้างโรคได้หลากหลายชนิด การติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อนี้มีความสำคัญต่อสุขภาพของประชาชนเนื่องจากการพัฒนาสายพันธุ์ดื้อยาหลายชนิดโดยเฉพาะ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มเมธิซิลิน (methicillin) เช่น เพนนิซิลิน, ออกซาซิลิน และแอมพิซิลิน เป็นต้น มีสาเหตุมาจากการมียีน *mecA* การศึกษานี้ได้ทำการแยกและระบุสายพันธุ์เชื้อ MRSA จากตัวอย่างสวอปจุ่มของสุนัข จำนวน 155 ตัวอย่าง ตรวจพบลักษณะของโคโลนิของเชื้อ *S. aureus* จำนวน 93 ตัวอย่าง (60.0 %) จากนั้นทำการจำแนกลักษณะทางโมเลกุลเพื่อระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ยีน *thermonuclease (nuc)* และยีน *mecA* พบเชื้อจำนวน 88 (94.62 %) ตัวอย่าง และ 86 ตัวอย่าง (92.47 %) แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการแพร่เชื้อ *S. aureus* และ MRSA จากสัตว์สู่มนุษย์ที่สัมผัสกับสุนัขตัวเลี้ยง นอกจากนี้ ได้ทำการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากมนุษย์ที่มีสุขภาพดี จำนวน 118 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ยีนที่สร้างสารพิษ เช่น enterotoxin , exfoliative toxins, toxin shock syndrome toxin 1 (TSST-1) ผลการทดลองพบว่า สารพิษของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากพาหะของมนุษย์ที่มีสุขภาพดี จาก 118 ตัวอย่าง ตรวจพบลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ TSST-1 จำนวน 38 ตัวอย่าง และยีนที่สร้างสารพิษชนิด *S. aureus enterotoxins (sea)* 30 ตัวอย่าง ผลการทดลองเป็นไปว่าคนที่มีสุขภาพดีเป็นพาหะของ *S. aureus* จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเทคนิคพีซีอาร์ใช้ระบุยีนของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษและยีนดื้อยาได้ ให้ผลที่รวดเร็ว เชื่อถือได้และราคาไม่แพง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างน้ำแข็ง

ตัวอย่างน้ำแข็งได้จากแหล่งจำหน่ายต่างๆ ในเขตลาดกระบัง รวม 34 ตัวอย่าง ดังนี้

3.1.1 ตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง จำนวน 8 ตัวอย่าง

3.1.2 ตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านเครื่องดื่ม ในเขตลาดกระบัง จำนวน 12 ตัวอย่าง

3.1.3 ตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารตามสั่ง ในเขตลาดกระบัง จำนวน 9 ตัวอย่าง

3.1.4 ตัวอย่างน้ำแข็งจากถังวัดอุณหภูมิในเขตลาดกระบัง จำนวน 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างบรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ AKL1034, AKL1039 และ ATC6538 ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง ได้รับจากห้องปฏิบัติการ คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 สารเคมี

95% Ethanol	(องค์การสุราไทย, ประเทศไทย)
99.5 % Glycerol	(QRèC™, Thailand)
10× Taq Buffer with KCL	(Thermo Scientific™, USA)
25 mM MgCl ₂	(Thermo Scientific™, USA)
10 M dNTP	(Thermo Scientific™, USA)
10 μM Forward Primer	(Fermentas, USA)
10 μM Reward Primer	(Fermentas, USA)
5 U/ul Taq DNA polymerase	(Thermo Scientific™, USA)
Agarose gel	(Vivantis, USA)
100 Bp plus DNA marker	(Thermo Scientific™, USA)
Ethidium bromide	(PanReac AppliChem, Spain)
Tris-acetate-EDTA buffer (TAE buffer)	(Vivantis, USA)
6×Loading dye	(Fermentas, USA)
สีคริสตัลไวโอเลต (Gram crystal violet)	
สารละลายไอโอดีน (Gram iodine)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะซีโตนแอลกอฮอล์ (Gram decolorized)

สีซาฟรานิน (Gram safranin)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ไข่ไก่	(Betagro, Thailand)
Baird-Parker (BP) medium	(Difco, U.S.A)
Brain heart infusion (BHI) broth	(Difco, U.S.A)
Buffered peptone water (BPW)	(Difco, U.S.A)
Plate count agar	(Difco, U.S.A)
Rabbit plasma	(Becton, U.S.A)
Trypticase soy agar (TSA)	(Difco, U.S.A)
Trypticase soy sheep blood agar	(Becton, U.S.A)
Tryptone broth	(Difco, U.S.A)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 อุปกรณ์

กระตาดชกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน	(Sartorius, Germany)
กรวยกรอง (Funnel)	
กระจกสไลด์ (Microscope slide)	
กระบอกตวง (Cylinder)	
ขวดดูแรน (Laboratory bottle)	
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	
เข็มฉีดยา (Needle)	
จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร	
จานเพาะเชื้อพลาสติก (Plastic petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร	
ช้อนตักสาร (Spatula)	
ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)	
ถุงดีดตัวอย่าง (Stomacher bag)	
ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (Steriled plastic bag)	
แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)	
บีกเกอร์ (Beaker)	
ปากคีบ (Forcep)	
ปิเปต (Graduated pipette)	
ปิเปตทิป (Pipette tips)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกยางดูดบีบ (Rubber bulb)
 หลอดดักแก๊สขนาด (Durham tubes)
 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด
 หลอดหยด (Dropper)
 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.4.2 เครื่องมือ

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	(Thermofisher, Germany)
เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)	(i-mupid, Japan)
เครื่องชุดถ่ายภาพเจลและโปรแกรมวิเคราะห์ (Gel Documentation)	(Bio Rad, USA)
ไมโครปิเปต (micropipette)	(Bio Rad, USA)
เครื่องตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR cycler)	(Eppendof, Germany)
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV spectrophotometer)	(MondoTech, Thai)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	(Ohaus Corp. Pine Brook, U.S.A)
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)	(Metler Toledo, China)
เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลายความเร็วต่ำ (spin down)	(Liofuge, Germany)
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer)	(Sanyo, Japan)
ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Freezer)	(Eppendof, UK.)
ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)	(Heraeus, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet : BSC)	(Astec Microflow, UK)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Thermo Scientific, USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
ชุดเครื่องกรองสุญญากาศ (Microfiltration assembly)	(Glassco, India)
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)	(HumaScope, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.5.1 การสำรวจข้อมูลเบื้องต้นและสุขอนามัยของตัวอย่างน้ำแข็งในร้านอาหารริมทาง

สำรวจร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และร้านอาหารที่จัดจำหน่ายน้ำแข็ง ภายในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือนกรกฎาคม 2562 – เดือนมกราคม 2563 สอบถามข้อมูลผู้ประกอบการร้านค้าและพนักงานจำหน่ายน้ำแข็ง พร้อมได้ทำการสังเกตสภาพต่างๆ ของร้านค้าและพื้นที่โดยรอบ เพื่อรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งผลิตน้ำแข็ง สอบถามข้อมูลการขนส่งน้ำแข็งมาที่ร้าน ถูบบรรจุภัณฑ์น้ำแข็งที่ใช้จัดเก็บและขนส่ง สถานที่ตั้งถังน้ำแข็ง ลักษณะของถังน้ำแข็งที่ใช้สำหรับน้ำแข็งและถังเก็บวัตถุดิบ การดูแลทำความสะอาดถังน้ำแข็ง นอกจากนี้ยังได้สังเกตสุขลักษณะของพนักงานจำหน่ายในการตักน้ำแข็ง และอุปกรณ์ที่ใช้ตักน้ำแข็ง

3.5.2 การเก็บตัวอย่างน้ำแข็ง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และร้านอาหาร รวมทั้งสิ้น 34 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างโดยให้ร้านค้าและพนักงานตักน้ำแข็ง ประมาณ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกใส จำนวน 2 ถุง แล้วปิดปากถุงให้แน่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำในกล่องเก็บความเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ นำส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร คณะอุตสาหกรรมอาหาร และเก็บรักษาน้ำแข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำแข็ง

ละลายตัวอย่างน้ำแข็ง จากข้อ 3.5.2 ที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้ว เทใส่ในปิกรเกอร์ปลอดเชื้อ ขนาด 1000 มิลลิลิตร ในตู้ปลอดเชื้อ ก่อนนำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยา

3.5.3.1 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1) ตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

นำตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้วจากข้อ 3.5.3 ทำการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (Mako et al., 2014) โดยใช้หัววัด (probe meter) จุ่มหัววัดลงไปในตัวอย่างน้ำ แล้วทำการบันทึกค่า pH ที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2) ตรวจวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity)

นำตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้วจากข้อ 3.5.3 ทำการวิเคราะห์ค่าการนำไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง conductivity meter (Mako et al., 2014) เพื่อทำการวัดค่าสภาพการนำไฟฟ้าของน้ำ โดยการใช้หัววัด (probe) จุ่มลงในน้ำแข็งตัวอย่างที่ละลายแล้ว ทำการบันทึกค่าที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5.3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

ตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้วจากข้อ 3.5.3 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *S. aureus* ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Settanni et al., 2017)

นำตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายแล้ว เจือจางที่ความเข้มข้น 1:1 1:10 1:100 และ 1:1000 ปิเปตลงบนจานเพาะเชื้อ เทด้วยอาหาร plate count agar 12-15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแข็ง นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง (BAM, 2001) และนับจำนวน แล้วคำนวณ จุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง

3.5.3.2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *S. aureus*

นำตัวอย่างน้ำแข็งที่ละลายจากข้อ 3.5.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านชุดกรองเมมเบรน ที่มีแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอนที่ปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ คีบแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการกรองแล้ว ลงในอาหาร Baird-Parker agar ในจานพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Lee et al., 2017) ตรวจนับโคโลนีที่มีลักษณะสีดำ กลม นูน ขอบเรียบ มันวาว มีตะกอนขุ่นรอบโคโลนี และมีโซนใสล้อมรอบ คัดเลือกโคโลนีที่ต้องสงสัย มาทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) ของ *S. aureus* โดยดูการแข็งตัวของพลาสมา (plasma) โดยการเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวอย่างน้อย 1 โคโลนี ถ่ายลงใน BHI broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีที่ผลการทดสอบ coagulase test มีระดับการจับตัวเป็นก้อน +4 (BAM, 2016) นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์โดยการย้อมแกรมในขั้นตอนถัดไป

การทดสอบ coagulase test (BAM, 2016)

ปิเปตเชื้อจากหลอด BHI broth ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเปล่าที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติม coagulase plasma ที่มีส่วนผสมของ EDTA ลงไป 0.125 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตการจับตัวทุกๆ ชั่วโมง ในระยะเวลา 4 ชั่วโมงแรก หากไม่เกิดการจับตัวภายในระยะเวลาดังกล่าวให้ทำการบ่มต่ออีกจนครบ 6-8 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

ระดับการจับตัวของเชื้อและ coagulase plasma

ระดับการจับตัว

ลักษณะที่ปรากฏ

0

ไม่เกิดการจับตัว

1+

จับตัวเป็นก้อนน้อย ไม่รวมกลุ่ม

2+

จับตัวเป็นก้อนน้อยรวมกลุ่ม

3+

จับตัวเป็นก้อนใหญ่

4+

จับตัวเป็นก้อนหมดทั้งหลอด และไม่ขยับเมื่อคว่ำหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรายงานผล coagulase test นับจำนวนหลอดที่ให้ผลเป็นบวก ของแต่ละระดับ ความเจือจาง บันทึกลงเป็นบวกเมื่อลักษณะการจับตัวอยู่ในระดับ 4+ แล้วนำผลที่ได้ ไปทำการศึกษาทาง สันฐานวิทยาเพื่อยืนยันว่าเชื้อที่พบ คือ *S.aureus*

3.5.3.2.3 การแยกเชื้อและเก็บเชื้อจุลินทรีย์

ทำการส้อมเก็บตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างเอนไซม์ coagulase มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดย cross streak ลง TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ใช้ลูปถ่ายเชื้อ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 18-20 ชั่วโมง เก็บเป็น stock culture จากนั้นปิเปตเชื้อ *S. aureus* ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงใน หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมเชื้อ ให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA มาทำการเลี้ยง เชื้อในอาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาลักษณะทางสันฐาน วิทยาของจุลินทรีย์โดยการย้อมแกรม

3.5.3.2.4 การศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของจุลินทรีย์โดยการย้อมสี แบบ แกรม

นำเชื้อ *S. aureus* ที่บริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง มาทำการเลี้ยงเชื้อใน อาหาร TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาของ จุลินทรีย์โดยการย้อมแกรม ดังนี้ (ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุนทหารลาดกระบัง, 2558)

- 1) หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ทั่วรอยเสมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
- 2) ล้างสีออกด้วยน้ำจากกระบอกฉีดน้ำ ที่เปิดให้ไหลเบาๆ แล้วหยดน้ำยาแกรม ไอโอดีนให้ทั่วรอยเสมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
- 3) ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วย 95% alcohol ซึ่งทำได้ โดยการจับสไลด์ในลักษณะท่ามุม 45 องศา หยด 95% alcohol ที่ปลายด้านบนสไลด์ โดยให้ alcohol ไหล ผ่านผิวหน้ารอบเสมียร์ จนกระทั่ง alcohol ที่ไหลลงมาไม่มีสี ไม่ควรใช้เวลาเกิน 2 วินาที แล้วล้างออก ด้วยน้ำทันที
- 4) ย้อมทับด้วยสี safranin ซึ่งทำได้โดยหยดสี ลงบนสไลด์ให้ทั่วรอยเสมียร์ ทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 นาที
- 5) ล้างออกด้วยน้ำ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศ หรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
- 6) ตรวจผลโดยนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4 การจำแนกและระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction

3.5.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของ *S. aureus*

3.5.4.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของ *S. aureus*

การสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากนำเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้ มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 5 ครั้ง หลังจากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Presto™ Food DNA Extraction (Geneaid, Taiwan) ตรวจวัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำพีซีอาร์ และวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.5.5.1.2 การวัดความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากภาควิชา พันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

นำสารละลายดีเอ็นเอ วัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาว ด้วยเครื่องวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (A260) และ (A280) คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A260 / A280 เพื่อประมาณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A260 / A280 เท่ากับ 1.8-2.0

สูตรคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอมีดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng / } \mu\text{l)} = 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Dilution factor} \times \text{A260}$$

3.5.4.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.5.4.2.1 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* โดยใช้ไพรเมอร์ GFEMA nucA และ SAnucA (ตารางที่ 3.1)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปิเปตสารต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ โดยเรียงลำดับการใส่ทีละตัว เรียกว่า master mix โดยในการคำนวณปริมาตรสารต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ จะต้องคำนวณปริมาตรสารให้เกิน 1 เท่า เพื่อป้องกันการเกิด pipet error โดยในการปิเปตสารต่างๆลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นแบ่ง master mix ลงในหลอด พีซีอาร์ หลอดละ 9 ไมโครลิตร

ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอของเชื้อ (ความเข้มข้น 10 ng/ μ l) ปริมาตร 1 μ l ลงในหลอด พีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μ l รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μ l โดยจะมีหนึ่งหลอดที่เป็น negative control ปิเปตน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 μ l ลงในหลอด พีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μ l รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μ l จากนั้นนำหลอด พีซีอาร์ ที่ได้ไปใส่ในเครื่อง พีซีอาร์ cycler ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 : โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus*

โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'→ 3'	ขนาดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
GFEMA-1 GFEMA-2	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	132 bp	Brakstad et al. (2018)
nucA-F nucA-R	GCA ATT GAT GGG TGA TAC GGT T AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	310 bp	Kobayashi et al. (1994)
SAnucA-F SAnucA-R	GCT TGC TAT GAT TGT GGT AGC C TCT CTA GCA AGT CCC TTT TCC A	423 bp	Wongboot et al. (2013)

ตารางที่ 3.2 : สารต่างๆในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus*

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterile water)	5.7	
2. 10× Taq buffer with KCl	1	1x
3. 25 mM MgCl ₂	1	2.5 mM
4. 10 mM dNTP	0.2	0.5 mM
5. 10 μM Forward Primer	0.5	0.5 μM
6. 10 μM Reward Primer	0.5	0.5 μM
7. 5 U/ul Taq DNA Polymerase	0.1	2.5 U
8. DNA template (10 ng/ul)	1	
รวม	10	

ขั้นตอนพีซีอาร์ :

- ปฏิกิริยาเริ่มแรกของขั้นตอน denaturation : 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ
 - ขั้นตอน denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 - ขั้นตอน annealing 55 องศาเซลเซียส 30 นาที
 - ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - ขั้นตอนสิ้นสุด extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อจำแนกเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา methicillin โดยใช้ไพรเมอร์ GMECA mecA และ M1 (ตารางที่ 3.3)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปิเปตสารต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.4 ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ โดยเรียงลำดับการใส่ทีละตัว เรียกว่า master mix โดยในการคำนวณปริมาตรสารต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา พีซีอาร์ จะต้องคำนวณปริมาตรสารให้เกิน 1 เท่า เพื่อป้องกันการเกิด pipet error โดยในการปิเปตสารต่างๆลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นแบ่ง master mix ลงในหลอด พีซีอาร์ หลอดละ 9 ไมโครลิตร

ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอของเชื้อ ปริมาตร 1 μ l ลงในหลอด พีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μ l รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μ l โดยจะมีหนึ่งหลอดที่เป็น negative control ปิเปตน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 μ l ลงในหลอด พีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μ l รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μ l จากนั้นนำหลอด พีซีอาร์ ที่ได้ไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อไป

ตารางที่ 3.3 : ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' -> 3'	ขนาดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
GMECA-1 GMECA-2	ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG	163 bp	Mehrotra et al. (2000)
mecA-F mecA-R	GAA ATG ACT GAA CGT CCGATA A CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	310 bp	Mehrotra et al. (2000)
M1-F M2-R	GAT GGC TAT CGT GTC ACA ATC G ATC TGG AAC TTG TTG AGC AGA C	312 bp	Wongboot et al. (2013)

ตารางที่ 3.4 : สารต่างในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อยา

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterile water)	5.7	
2. 10x Taq buffer with KCl	1.0	1x
3. 25 mM MgCl ₂	1.0	2.5 mM
4. 10 mM dNTP	0.2	0.5 mM
5. 10 μ M Forward Primer	0.5	0.5 μ M
6. 10 μ M Reward Primer	0.5	0.5 μ M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. 5 U/ul Taq DNA Polymerase	0.1	0.5 U
8. DNA template (10 ng/ul)	1.0	
รวม	10	

ขั้นตอนพีซีอาร์ :

- ปฏิบัติการเริ่มแรกของขั้นตอน denaturation : 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
- ปฏิบัติการพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ
 - ขั้นตอน denaturation 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
 - ขั้นตอน annealing 57 องศาเซลเซียส 2 นาที
 - ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - ขั้นตอนสิ้นสุด extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

3.5.5.2.3 การทำปฏิบัติการพีซีอาร์ระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยใช้ไพรเมอร์ GSEA, SAseb, GSEC และ SASed (ตารางที่ 3.5)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ปิเปตสารต่างๆที่ใช้ในปฏิบัติการ พีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.6 ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ โดยเรียงลำดับการใส่ทีละตัว เรียกว่า master mix โดยในการคำนวณปริมาตรสารต่างๆที่ใช้ในปฏิบัติการ พีซีอาร์ จะต้องคำนวณปริมาตรสารให้เกิน 1 เท่า เพื่อป้องกันการเกิด pipet error โดยในการปิเปตสารต่างๆลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นแบ่ง master mix ลงในหลอด พีซีอาร์ หลอดละ 9 ไมโครลิตร

ปิเปตสารละลายดีเอ็นเอของเชื้อ (ความเข้มข้น 10 ng/μl) ปริมาตร 1 μl ลงในหลอดพีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μl รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μl โดยจะมีหนึ่งหลอดที่เป็น negative control ปิเปตน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 μl ลงในหลอด พีซีอาร์ ที่มี master mix ปริมาตร 9 μl รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μl จากนั้นนำหลอด พีซีอาร์ที่ได้ไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อไป

ตารางที่ 3.5 : ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' -> 3'	ขนาดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
GSEA-1 GSEA-2	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	102 bp	Mehrotra et al. (2000)
SASea-F SASea-R	ACC GTT TCC AAA GGT ACT GTA CCT AAA CCA GAT GAG TTG CAC	135 bp	Wongboot et al. (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SASeb-F SASeb-R	CCT TAA ACC AGA TGA GTT CAC CAG GCA TCA TGT CAT ACC AAA	592 bp	Wongboot et al. (2013)
GSEC-1 GSEC-2	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG CTT CAC ACT TTT AGA AAT CAA CCG	454 bp	Wongboot et al. (2013)
SAsed-F SAsed-R	GCT TGT ACA TAT GGA GGT GTC A GAC CCA TCA AGA AGA ATC AAC T	263 bp	Wongboot et al. (2013)

ตารางที่ 3.6 : สารต่างในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกลักษณะของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterile water)	5.7	
2. 10x Taq buffer with KCl	1.0	1x
3. 25 mM MgCl ₂	1.0	2.5 mM
4. 10 mM dNTP	0.2	0.5 mM
5. 10 μM Forward Primer	0.5	0.5 μM
6. 10 μM Reward Primer	0.5	0.5 μM
7. 5 U/ul Taq DNA Polymerase	0.1	0.5 U
8. DNA template (10 ng/ul)	1.0	
รวม	10	

ขั้นตอนพีซีอาร์ :

- ปฏิกิริยาเริ่มแรกของขั้นตอน denaturation : 94 องศาเซลเซียส 5 นาที
- ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ
 - ขั้นตอน denaturation 94 องศาเซลเซียส 2 นาที
 - ขั้นตอน annealing 55 องศาเซลเซียส 2 นาที
 - ขั้นตอน extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - ขั้นตอนสิ้นสุด Extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

3.5.5.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหิว เตรียมสารละลายอะกาโรส (1.8% สำหรับ

ไพรเมอร์ GFEMA, nucA, SAnucA, GMECA, mecA, M1(mecA), GSEA, Saseb, GSEC และ SAsed เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2.0% สำหรับไพรเมอร์ GSEA) โดยการซึ่งผงอะกาโรส เติม TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเพื่อให้อะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง เติม ethidium bromide 4 ไมโครลิตร จากนั้นเทลงในภาชนะที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหัวออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส เท TAE buffer ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ หรือผลผลิตพีซีอาร์ จากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรรวม 12 ไมโครลิตร (สารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร, 6×loading dye ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร) แล้วใส่ลงไปที่ช่องเจล แต่ละช่องโดยดูดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus ladder) ปริมาตรรวม 6 ไมโครลิตร (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2.0, ไมโครลิตรสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 2.0 ไมโครลิตร, 6×loading dye ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร) แล้วใส่ลงไปที่ช่องเจล เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าใช้แรงเคลื่อน ไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วจึงปิดเครื่อง จากนั้นนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแน่นอน (marker) ทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษา แล้วถ่ายรูปและบันทึกด้วยเครื่อง Gel Documentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาวิจัยเรื่องการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ในน้ำแข็งและสุขลักษณะสภาพสุขาภิบาลของร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม และ ร้านอาหาร ภายในบริเวณเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ผู้วิจัยนำเสนอข้อมูลเป็น 5 ส่วน ดังนี้

1. ผลการสำรวจร้านอาหารริมทาง
2. ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีของน้ำแข็ง
3. ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในน้ำแข็ง
4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในน้ำแข็ง
5. ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในน้ำแข็ง โดยวิธีทางโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.1 ผลการสำรวจร้านอาหารริมทาง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในเขตลาดกระบัง จำนวน 34 ตัวอย่างจากร้านอาหารริมทาง ร้านขายเครื่องดื่ม ร้านอาหาร และถึงเก็บวัตถุดิบร้านอาหาร โดยดำเนินการวิจัยระหว่างเดือนกรกฎาคม 2562 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2563

4.1.1 ข้อมูลและลักษณะของร้านอาหารที่เก็บตัวอย่าง

1) ร้านอาหารริมทาง

ร้านอาหารริมทาง เป็นร้านอาหารที่ตั้งอยู่บริเวณริมถนน มีลักษณะเปิดโล่ง ประกอบด้วยร้านค้า จำนวน 8 ร้านค้า (ตัวอย่างที่ 12-15, 18 ,20A, 66, 67 และ 71) ร้านริมทางส่วนใหญ่ที่ทำการสำรวจเป็นร้านขายเครื่องดื่ม ตั้งอยู่ริมถนน พบว่าบริเวณรอบข้าง มีการเปิดโล่ง ทำให้มีการสะสมของอากาศที่เป็นมลพิษ จากควันรถ หรืออากาศจากภายนอก ถึงน้ำแข็งมีการล้างทำความสะอาดวันละครั้งหรือ บางร้านมีการเก็บน้ำแข็งเพื่อใช้ในวันถัดไป โดยไม่ได้ทำการล้างทำความสะอาด อุปกรณ์ช่วยตักน้ำแข็งใช้วัสดุจากโลหะผสมเหล็กทำให้เกิดสนิม มีการใช้ชามหรือจานในการช่วยตักน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากบริเวณนิ้วมือที่จับชามหรือจานได้ สุขลักษณะของคนขาย ไม่มีการป้องกันโดยไม่ได้สวมใส่ถุงมือ ไม่มีการสวมใส่หมวกเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และพบมีการแช่ในส่วนของขวดน้ำหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการขายลงในถังน้ำแข็ง ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามได้ง่ายจากอากาศภายนอกและสุขลักษณะการสุขาภิบาลของร้านค้า ดังภาพที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะร้านอาหารริมทางที่ตั้งอยู่บริเวณริมถนน และบริเวณรอบร้านอาหารริมทาง (ก และ ข)
ลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง ของร้าน (ค และ ง)

2) ร้านขายเครื่องดื่ม

ร้านขายเครื่องดื่ม มีลักษณะเป็นร้านเปิดและร้านแบบปิด ประกอบด้วยร้านค้า จำนวน 12 ร้านค้า (ตัวอย่างที่ 21A, 23A, 31A, 39A, 54-57, 60, 63-65) ร้านขายเครื่องดื่มที่มีลักษณะร้านแบบปิด มีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศให้อากาศภายในถ่ายเท ทำให้ไม่มีการรบกวนจากอากาศภายนอก ร้านขายเครื่องดื่ม พบมีการเก็บรักษาน้ำแข็ง 2 บริเวณ คือ ภายในร้านและภายนอกข้างหลังร้าน ซึ่งมีการนำน้ำแข็งจากข้างนอกร้านมาเท ใส่ภาชนะด้านในซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากการยกน้ำแข็งเทลงไปรวมกันได้ ร้านเครื่องดื่มบางร้านมีการใช้ถ้วยเครื่องดื่มในการตักน้ำแข็ง อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจากบริเวณนิ้วมือที่จับบริเวณแก้วภาชนะที่ใส่เครื่องดื่มได้ ไม่มีการสวมถุงมือหรือสวมหมวก ร้านขายเครื่องดื่มจะมีการล้างถังภาชนะในการใส่น้ำแข็งทุกวัน 2 วันครั้ง หรือรองน้ำแข็งหมด ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



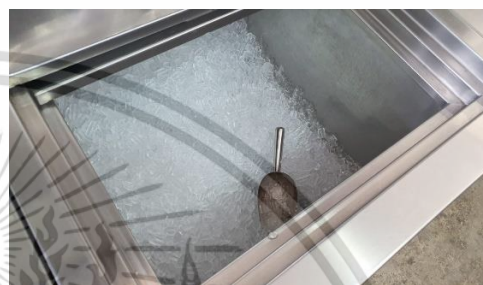
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.2 ลักษณะร้านขายเครื่องดื่ม (ก และ ข) และลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง (ค และ ง)

3) ร้านอาหาร

ร้านอาหาร เป็นร้านอาหารแบบปิด ตั้งบริเวณริมถนน เป็นอาคารพาณิชย์ ประกอบด้วยร้านค้า 9 ร้านค้า (ตัวอย่างที่ 13A, 33A, 38A, 40A, 51-1, 52, 59, 69 และ 70) ร้านอาหารมีการติดตั้งเครื่องปรับอากาศ และพัดลม ทำให้เกิดการรบกวนจากอากาศภายนอกได้น้อย ร้านอาหารพบมีถึงภาชนะเก็บน้ำแข็ง 2 ถัง แบ่งเป็น ถังน้ำดื่มและถังเก็บวัตถุดิบ บางร้านมีการแช่ขวดน้ำหรือวัตถุดิบลงไปในถังภาชนะเก็บน้ำแข็งสำหรับดื่ม ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากวัตถุดิบที่แช่ลงไปได้ มีการใช้ชามหรือจานในการช่วยตักน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากบริเวณปลายนิ้ว ผู้ปฏิบัติงานในร้านส่วนใหญ่พบไม่มีการสวมถุงมือและการสวมหมวกตาข่าย อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามได้ จากภาพที่ 4.4 (ข) เป็นลักษณะร้านอาหารที่มีลักษณะร้านแบบปิด ทำให้ไม่มีอากาศหรือมลภาวะจากภายนอกมากระทบต่อน้ำแข็งที่อยู่ภายในถัง ลักษณะร้านมีความสะอาด ภายในถังเก็บน้ำแข็งไม่มีสิ่งของหรือวัตถุดิบ ปะปนอยู่ภายในถัง ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อย จากภาพที่ 4.4 (ง) เป็นลักษณะของผู้ปฏิบัติงานที่มีสุขลักษณะที่ดี มีการสวมผ้ากันเปื้อนและสวมหมวกตาข่ายกันเส้นผมร่วงลงไปในน้ำแข็ง และมีการใช้อุปกรณ์ตักน้ำแข็งที่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะร้านอาหาร (ก และ ข) และลักษณะการจัดเก็บน้ำแข็ง (ค และ ง)

4) ถังเก็บวัสดุขีบริ่ร้านอาหาร

ถังเก็บวัสดุขีบริ่ร้านอาหาร เป็นถังน้ำแข็งที่ใช้สำหรับเก็บวัสดุขีบริ่ที่ใช้ในการประกอบอาหาร เช่น เนื้อสัตว์, เนื้อแปรรูปที่และ ส่วนผสมในการทำอาหารจากรั่ร้านอาหาร (ร้านที่ 33A) มีการจัดเก็บวัสดุขีบริ่ที่ใช้ในการประกอบอาหารภายในถุงพลาสติกหรือในถั่ยขาม ซึ่งไม่มีการบรรจุใส่กล่องหรือภาชนะที่มีฝาปิดแน่นสนิท ทำให้มีการปนเปื้อนจากการนำวัสดุขีบริ่ออกมาใช้ประกอบอาหารแล้วเมื่อจัดเก็บไม่ได้มีการทำความสะอาดภาชนะที่ใช้บรรจุวัสดุขีบริ่ ทำให้เกิดการปนเปื้อนภายในถังน้ำแข็งจากภาพที่ 4.5 ภาพที่ (ก) และ(ค) และไม่ได้ทำความสะอาดถังน้ำแข็งเป็นประจำทำให้ถังน้ำแข็งมีความสกปรก จากภาพที่ 4.5 ภาพที่ (ข)และ(ง) ใช้อุปกรณ์ในการตักที่มีด้ามจับขนาดยาวทำให้ ลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ และ สุขลักษณะอนามัยที่ดีของผู้ปฏิบัติงาน ในการใส่ผ้ากันเปื้อนและสวมหมวกตาข่าย ทำให้ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.4 ถึงเก็บวัตุดิบร้านอาหาร (ก และ ข) และการจัดการ (ค และ ง)

4.1.2 น้ำแข็งที่เก็บตัวอย่าง

น้ำแข็งที่เก็บตัวอย่างจากร้านค้า แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ น้ำแข็งบด, น้ำแข็งก้อนเล็กและน้ำแข็งก้อนใหญ่ ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 34 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น น้ำแข็งบดจำนวน 4 ตัวอย่าง น้ำแข็งก้อนเล็กจำนวน 14 ตัวอย่าง และน้ำแข็งก้อนใหญ่ จำนวน 16 ตัวอย่าง การใช้งานของน้ำแข็ง จากการสำรวจร้านค้าที่เก็บตัวอย่างน้ำแข็งบด พบว่าเป็นร้านค้าประเภทเครื่องดื่มและร้านอาหาร ประเภทถึงวัตุดิบ ใช้ในการทำน้ำปั่นหรือใช้ในการช่วยเก็บถนอมวัตุดิบอาหาร ตัวอย่างน้ำแข็งก้อนเล็ก พบว่าเป็นร้านขายเครื่องดื่ม ใช้ในการใส่เครื่องดื่ม น้ำปั่น และการแช่วัตุดิบ และตัวอย่างน้ำแข็งก้อนใหญ่ พบว่าส่วนใหญ่ใช้ในการให้ลูกค้าบริโภค โดยส่วนมากไม่มีการใส่วัตุดิบหรือวัสดุอื่นๆ ลงไปในถัง ซึ่งจะมีส่วนน้อยที่นำขูดน้ำหรือวัสดุถ้วยชาในการตักน้ำแข็ง

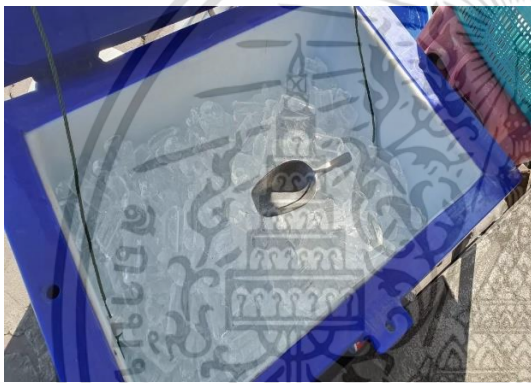
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 4.5 น้ำแข็งที่เก็บตัวอย่างได้จากร้านค้า (ก) ร้านขายเครื่องดื่ม ประเภทน้ำแข็งก้อนเล็ก (ข) ร้านขายอาหารประเภทถังวัดตูดิบ น้ำแข็งบด (ค) ร้านอาหาร(ถังน้ำดื่ม) ประเภทน้ำแข็งก้อนใหญ่ (ง) ร้านขายอาหาร (ถังน้ำดื่ม) น้ำแข็งก้อนใหญ่ มีการแช่ขวดน้ำในถังน้ำแข็ง

4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีน้ำแข็ง

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็ง

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีจากตัวอย่างน้ำแข็งร้านอาหารริมทาง ร้านเครื่องดื่ม และร้านอาหาร และถังภาชนะที่เก็บวัดตูดิบ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจำนวน 34 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ค่าพีเอชในน้ำแข็งที่ทำการละลายแล้ว จากนั้นทำนำค่าที่วัดได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของน้ำแข็ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) และฉบับที่ 134 (พ.ศ. 2534) ดังนี้

เกณฑ์คุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำแข็ง ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) และ 134 (พ.ศ.2534) ระบุไว้ว่า กำหนดให้น้ำแข็ง เป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพมาตรฐาน หลักเกณฑ์เงื่อนไขและวิธีการผลิต เพื่อจำหน่ายหรือจำหน่าย กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุ การใช้ภาชนะบรรจุ การเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บรักษา และฉลาก สีต้องไม่เกิน 20 อาเซนยูนิต ความขุ่น ต้องไม่เกิน 0.5 ซิลิกาสะเกล และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต้องอยู่ระหว่าง 6.5-8.5

1) ร้านอาหารริมทาง

จากการตรวจสอบวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง เปรียบเทียบกับ เกณฑ์มาตรฐานของน้ำแข็ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 และ 134 จำนวนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 12-15, 18, 20A, 66, 67 และ 71 ตามลำดับ โดยทำการวิเคราะห์ค่าทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำมาเฉลี่ย (ตารางที่ 4.1) พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 66 และ 67 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการนำไฟฟ้าในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง

ตัวอย่างที่	คุณภาพ*	ความเป็นกรดด่าง (pH)	การนำไฟฟ้า (Conductivity) ($\mu\text{s}/\text{cm}$)
12	ไม่ผ่าน	$6.13^a \pm 0.00$	$2.32^b \pm 0.00$
14	ไม่ผ่าน	$6.48^b \pm 0.00$	$23.10^f \pm 0.00$
15	ผ่าน	$7.41^d \pm 0.00$	$15.34^e \pm 0.00$
18	ผ่าน	$8.12^e \pm 0.00$	$1.35^d \pm 0.00$
20A	ผ่าน	$6.58^a \pm 0.00$	$130^g \pm 0.00$
66	ไม่ผ่าน	$6.19^a \pm 0.11$	$1.66^a \pm 0.01$
67	ไม่ผ่าน	$6.22^f \pm 0.09$	$13.32^d \pm 0.59$
71	ไม่ผ่าน	$9.03^c \pm 0.03$	$5.56^c \pm 0.04$

หมายเหตุ: *เกณฑ์คุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำแข็ง ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) และ 134 (พ.ศ.2534) ระบุไว้ว่า ความเป็นกรด-ด่างของน้ำแข็ง อยู่ระหว่าง 6.5 – 8.5

a-g หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

2) ร้านขายเครื่องดื่ม

จากการตรวจสอบวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายเครื่องดื่ม นำมาเปรียบเทียบกับ เกณฑ์มาตรฐานของน้ำแข็ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 78 และ 134 จำนวนทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 21A, 23A, 31A, 39A, 54-57, 60, 63 และ 65 โดยทำการวิเคราะห์ค่าทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำมาเฉลี่ย (ตารางที่ 4.2) พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 23A และ 64 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34A, 51-2, 53A และ 58 โดยทำการวิเคราะห์ค่าทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำมาเฉลี่ย (ตารางที่ 4.4) พบว่ามีตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 30A, 34A และ 51-2 ตามลำดับ ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมี การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายอาหารประเภทถึงน้ำดื่ม

ตัวอย่างที่	คุณภาพ*	ความเป็นกรดด่าง (pH)	การนำไฟฟ้า(Conductivity) ($\mu\text{s}/\text{cm}$)
13	ไม่ผ่าน	$6.42^{\text{cde}} \pm 0.16$	$111.9^{\text{h}} \pm 2.03$
33A	ผ่าน	$6.21^{\text{bc}} \pm 0.08$	$62.33^{\text{s}} \pm 0.34$
38A	ผ่าน	$6.27^{\text{bcd}} \pm 0.08$	$7.78^{\text{d}} \pm 0.02$
40A	ไม่ผ่าน	$6.62^{\text{e}} \pm 0.00$	$5.99^{\text{c}} \pm 0.00$
51-1	ผ่าน	$5.26^{\text{a}} \pm 0.00$	$9.34^{\text{f}} \pm 0.00$
52	ผ่าน	$6.07^{\text{b}} \pm 0.13$	$7.74^{\text{d}} \pm 0.05$
59	ไม่ผ่าน	$6.5^{\text{de}} \pm 0.02$	$3.72^{\text{b}} \pm 0.00$
69	ไม่ผ่าน	$8.02^{\text{f}} \pm 0.23$	$2.05^{\text{a}} \pm 0.06$
70	ไม่ผ่าน	$8.89^{\text{g}} \pm 0.18$	$4.94^{\text{c}} \pm 0.20$

หมายเหตุ:เกณฑ์คุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำแข็ง ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527)และ 134 (พ.ศ.2534) ระบุไว้ว่า

a-g หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมี การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหาร ประเภทถึงเก็บวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่	คุณภาพ*	ความเป็นกรดด่าง (pH)	การนำไฟฟ้า(Conductivity) ($\mu\text{s}/\text{cm}$)
30A	ไม่ผ่าน	$8.61^{\text{e}} \pm 0.00$	$108.33^{\text{f}} \pm 0.00$
34A	ไม่ผ่าน	$6.21^{\text{b}} \pm 0.07$	$62.33^{\text{c}} \pm 0.40$
51-2	ไม่ผ่าน	$5.26^{\text{a}} \pm 0.13$	$9.34^{\text{b}} \pm 0.06$
53	ผ่าน	$7.02^{\text{d}} \pm 14.44$	$104.90^{\text{d}} \pm 0.51$
58	ผ่าน	$6.83^{\text{c}} \pm 0.08$	$2.80^{\text{a}} \pm 0.34$

หมายเหตุ:เกณฑ์คุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำแข็ง ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527)และ 134 (พ.ศ.2534) ระบุไว้ว่า

a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ภายนอกมหาวิทยาลัย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตัวอย่างน้ำแข็ง จำนวน 34 ตัวอย่าง พบ 13 ตัวอย่าง ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน อาจเกิดมาจากแหล่งผลิตน้ำแข็งที่ไม่ได้มาตรฐาน ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำแข็งก่อนมาจำหน่ายให้กับทางร้านอาหารไม่ผ่านเกณฑ์ หรืออาจเกิดจากการที่นำวัตถุดิบหรือภาชนะ ใส่ลงในถังเก็บน้ำแข็ง และการทำความสะอาดถังภาชนะที่เก็บไว้ไม่สะอาด อาจมีการใช้น้ำยาทำความสะอาดในการล้างถังน้ำแข็ง ทำให้เกิดค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่ได้มาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด

4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์

4.3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ในร้านขายอาหารริมทาง ร้านเครื่องดื่ม และร้านอาหารประเภทถึงน้ำดื่ม และถึงเก็บวัตถุดิบจากร้านอาหาร ในช่วงเดือน กรกฎาคม 2562 - กุมภาพันธ์ 2563 โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านค้า จำนวน 34 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *S. aureus* ซึ่งมีผลกระทบต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยเกิดการปนเปื้อนข้ามจากมนุษย์สู่น้ำแข็งหรืออาหารที่นำมาบริโภคได้ จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ฉบับที่ 78 (พ.ศ. 2527) และ 134 (พ.ศ. 2534) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ระบุไว้ว่า น้ำแข็งตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม น้อยกว่า 2.2 ต่อน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number) ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด อี.โคไล (*Escherichia coli*) และไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ประกาศฯ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) กำหนดให้ น้ำแข็ง “ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus*

นอกจากนี้ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 257-2521 เรื่อง น้ำบริโภค ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาไว้ว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count) ในน้ำบริโภค ไม่เกิน 500 cfu/ml

1) ร้านอาหารริมทาง

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 12, 14, 15, 18, 20A, 66, 67 และ 71 ตามลำดับ พบว่ามีตัวอย่างน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 5 ตัวอย่าง โดยพบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง จากตัวอย่างที่ 12, 14, 20A, 66 และ 67 (ตารางที่ 4.5) โดยสาเหตุการปนเปื้อนอาจมาจากการนำภาชนะขวดหรือวัตถุดิบ ใส่ลงในถังน้ำแข็ง เมื่อหยิบมาใช้ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากมือของผู้ขาย ไปยังน้ำแข็งที่เก็บไว้ในถังน้ำแข็ง ภายในถังน้ำแข็งไม่ได้มีการล้างทำความสะอาดเป็นประจำทุกวัน บริเวณพื้นที่รอบถังใส่น้ำแข็ง มีการนำถังขยะ หรือวัสดุอื่นๆ มาวางไว้ใกล้ถังใส่น้ำแข็ง ทำให้เป็นสาเหตุในการปนเปื้อนได้ พฤติกรรมของผู้ขายที่ไม่ได้มีการล้างมือเป็นประจำเมื่อหยิบหรือสัมผัสของวัตถุดิบหรือวัสดุในการขาย แล้วนำมือไปจับที่ถังน้ำแข็ง แล้วเมื่อใช้เสร็จไม่ได้มีการทำที่วางเอกสารเป็นเอกสารที่ส่งมอบให้กับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์ตักน้ำแข็งได้นำอุปกรณ์ตักน้ำแข็งลงไปใส่ไว้ภายในถังน้ำแข็งร่วมกับน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจากผู้ขายสู่น้ำแข็งได้ สภาพแวดล้อมบริเวณร้านค้า มีส่วนที่เป็นน้ำแข็งที่ละลายแล้วซึ่งอยู่ไหลไปตามท่อและภาชนะใส่น้ำแข็งมีลักษณะที่เก่าผุพัง ทำให้ไม่สามารถปิดฝาถังใส่น้ำแข็งให้สนิทได้ ทำให้สามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ ดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 สู่ลักษณะของบริเวณรอบร้านอาหารริมทางและภาชนะใส่น้ำแข็งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน ตารางที่ 4.5 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็งในร้านอาหารริมทาง

ตัวอย่าง	คุณภาพ*	Total plate count (cfu/ml)	<i>S. aureus</i> (cfu/100ml)
12	ไม่ผ่าน	179	57
14	ไม่ผ่าน	1280	39
15	ผ่าน	34	ND
18	ผ่าน	145	ND
20A	ไม่ผ่าน	44	89
66	ไม่ผ่าน	570	11
67	ไม่ผ่าน	610	ND
71	ไม่ผ่าน	2900	ND

หมายเหตุ: ND = not detect

*เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ฉบับที่ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) ระบุไว้ว่า น้ำแข็ง “ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Salmonella* spp. และ *S. aureus*

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 257- 2521 เรื่อง น้ำบริโภค ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาไว้ว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count) ไม่เกิน 500 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ร้านขายเครื่องดื่ม

จากการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านขายเครื่องดื่ม ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ได้แก่ 21A, 23A, 31A, 39A, 54-57, 60, 63-65 พบว่ามีตัวอย่างน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 7 ตัวอย่าง โดยพบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง จากตัวอย่างที่ 21, 56, 57, 64 (ตามตารางที่ 4.6) โดยสาเหตุการปนเปื้อนอาจมาจากการนำภาชนะขวดหรือวัตถุดิบ ใส่ลงในน้ำแข็ง เมื่อหยิบมาใช้ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากมือของผู้ขาย ไปยังน้ำแข็งที่เก็บใส่ในถังน้ำแข็ง ภายในถังน้ำแข็งไม่ได้มีการล้างทำความสะอาดเป็นประจำทุกวัน บริเวณพื้นที่รอบถังใส่น้ำแข็ง มีการนำถังขยะ หรือวัสดุอื่นๆ มาวางไว้ใกล้ถังใส่น้ำแข็ง ทำให้เป็นสาเหตุในการปนเปื้อนได้ พฤติกรรมของผู้ขายที่ไม่ได้มีการล้างมือเป็นประจำเมื่อหยิบหรือสัมผัสของวัตถุดิบหรือวัสดุในการขาย แล้วนำมือไปจับที่ตักน้ำแข็ง แล้วเมื่อใช้เสร็จไม่ได้มีการทำที่วางอุปกรณ์ตักน้ำแข็ง ได้นำอุปกรณ์ตักน้ำแข็งลงไปใส่ไว้ภายในถังน้ำแข็งร่วมกับน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจากผู้ขายสู่น้ำแข็งได้ สภาพแวดล้อมบริเวณร้านค้า มีส่วนที่เป็นน้ำแข็งที่ละลายแล้วขังอยู่ไหลไปตามท่อและภาชนะใส่น้ำแข็งมีลักษณะที่เก่าผุพัง ทำให้ไม่สามารถปิดฝาถังใส่น้ำแข็งให้สนิทได้ ทำให้สามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ

ตารางที่ 4.6 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านขายน้ำดื่ม

ตัวอย่าง	คุณภาพ	Total plate count cfu/ml	<i>S. aureus</i> cfu/100ml
21A	ไม่ผ่าน	145	119
23A	ผ่าน	<10 (3.5)	ND
31A	ไม่ผ่าน	805	ND
39A	ผ่าน	470	ND
54	ผ่าน	50	ND
55	ผ่าน	35	ND
56	ผ่าน	295	7
57	ผ่าน	320	3
60	ผ่าน	87	ND
63	ไม่ผ่าน	1110	ND
64	ไม่ผ่าน	1080	38
65	ผ่าน	48	ND

หมายเหตุ: ND = not detect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ฉบับที่ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) ระบุไว้ว่า น้ำแข็ง “ต้องไม่มี จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Salmonella* spp. และ *S. aureus*

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 257- 2521 เรื่อง น้ำ บริโภค ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาไว้ว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count) ไม่เกิน 500 cfu/ml



ภาพที่ 4.7 สุลักษณ์ของบริเวณรอบร้านขายน้ำดื่ม และใส่ขวดดับและวัสดุอื่น ๆ รวมกับน้ำแข็ง

3) ร้านอาหาร

3.1) ร้านอาหารประเภท ถังน้ำดื่ม

จากการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหาร ประเภทถังน้ำดื่ม ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ได้แก่ 13A, 33A, 38, 40A, 51-1, 52, 59, 69, 70 พบว่ามีตัวอย่าง น้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 1 ตัวอย่าง โดยพบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง จากตัวอย่างที่ 13A (ตามตารางที่ 4.7) โดยสาเหตุการปนเปื้อนอาจมาจากการนำ ภาชนะขวดหรือวัสดุดิบ ใส่ลงในถังน้ำแข็ง เมื่อหยิบมาใช้ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากมือของผู้ขาย ไปยัง น้ำแข็งที่เก็บใส่ในถังน้ำแข็ง ภายในถังน้ำแข็งไม่ได้มีการล้างทำความสะอาดเป็นประจำทุกวัน บริเวณพื้นที่ รอบถังใส่น้ำแข็ง มีการนำถังขยะ หรือวัสดุอื่นๆ มาวางไว้ใกล้ถังใส่น้ำแข็ง ทำให้เป็นสาเหตุในการปนเปื้อน ได้ พฤติกรรมของผู้ขายที่ไม่ได้มีการล้างมือเป็นประจำเมื่อหยิบหรือสัมผัสของวัสดุดิบหรือวัสดุในการขาย แล้วนำมือไปจับที่ตักน้ำแข็ง แล้วเมื่อใช้เสร็จไม่ได้มีการทำที่วางอุปกรณ์ตักน้ำแข็ง ได้นำอุปกรณ์ตักน้ำแข็ง ลงไปใส่ไว้ในถังน้ำแข็งร่วมกับน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจากผู้ขายสู่น้ำแข็งได้ สภาพแวดล้อมบริเวณร้านค้า ภาชนะใส่น้ำแข็งมีลักษณะที่เก่าผุพัง ทำให้ไม่สามารถปิดฝาถังใส่น้ำแข็งให้ สนิทได้ ทำให้สามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อ

ตารางที่ 4.7 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านอาหาร ประเภทถังน้ำดื่ม

ตัวอย่าง	คุณภาพ	Total plate count cfu/ml	<i>S. aureus</i> cfu/100ml
13A	ไม่ผ่าน	185	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33A	ผ่าน	58	ND
38A	ผ่าน	81	ND
40A	ไม่ผ่าน	2350	10
51-1	ผ่าน	76	ND
52	ผ่าน	<30 (16)	ND
59	ผ่าน	1040	ND
69	ผ่าน	99	ND
70	ผ่าน	420	ND

หมายเหตุ: ND = not detect

*เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ฉบับที่ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) ระบุไว้ว่า น้ำแข็ง “ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Salmonella* spp. และ *S. aureus*

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 257- 2521 เรื่อง น้ำบริโภค ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาไว้ว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count) ไม่เกิน 500 cfu/ml

4) ถึงเก็บวัตถุดิบจากร้านอาหาร

จากการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารประเภทถึงวัตถุดิบ ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ 30A, 34A, 51-2, 53A และ 58 พบว่ามีตัวอย่างน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 4 ตัวอย่าง โดยพบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง จากตัวอย่างที่ 53 (ตามตารางที่ 4.8) โดยสาเหตุการปนเปื้อนอาจมาจากการนำวัตถุดิบ เช่น เนื้อสัตว์, เนื้อแปรรูปหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการประกอบอาหาร ซึ่งมีการบรรจุใส่ถุงพลาสติกไม่มีการบรรจุใส่กล่องหรือภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการนำออกมาใช้แล้วนำเก็บกลับเข้าไปใหม่ โดยไม่ได้มีการทำความสะอาดภาชนะบรรจุ หรือมาจากสาเหตุการไม่ได้ล้างทำความสะอาดถังใส่น้ำแข็ง ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ในเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนบริเวณภายในถังน้ำแข็ง ความแตกต่างของถังน้ำแข็งจากร้านอาหาร ประเภทถึงวัตถุดิบ กับน้ำแข็งประเภทอื่นๆ คือ ถังวัตถุดิบจะเกิดการปนเปื้อนจากเนื้อสัตว์ที่มีการเก็บรักษาโดยใช้วิธีที่ไม่ถูกสุขลักษณะ น้ำแข็งประเภทอื่นๆ เช่น น้ำแข็งจากร้านขายน้ำดื่ม ส่วนมากจะปนเปื้อนจากผู้ปฏิบัติงานมีสุขลักษณะอนามัยของตัวบุคคลและสุขลักษณะในการจัดเก็บวางของที่ไม่ดี จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามจากผู้ปฏิบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

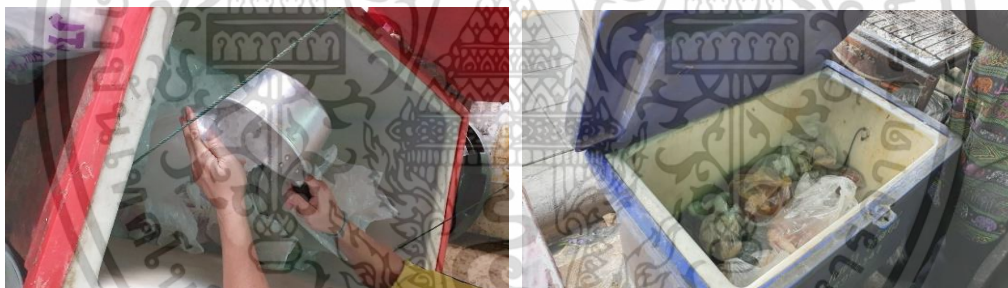
ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และ เชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็ง ภายในร้านอาหาร ประเภทถึงเก็บขวดตูดิบ

ตัวอย่าง	คุณภาพ	Total plate count cfu/ml	<i>S. aureus</i> cfu/100ml
30A	ไม่ผ่าน	2750	ND
34 A	ไม่ผ่าน	3250	ND
51-1	ผ่าน	76	ND
53	ไม่ผ่าน	11100	70
58	ไม่ผ่าน	6650	ND

หมายเหตุ: ND = not detect

*เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง ฉบับที่ ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) ระบุไว้ว่า น้ำแข็ง “ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค” ต้องไม่พบจุลินทรีย์ชนิด *Salmonella* spp. และ *S. aureus*

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 257- 2521 เรื่อง น้ำบริโภค ได้กำหนดคุณภาพทางจุลชีววิทยาไว้ว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (standard plate count) ไม่เกิน 500 cfu/ml



ภาพที่ 4.8 การใช้ภาชนะที่เป็นหม้อ ในการตักน้ำแข็งและถึงเก็บขวดตูดิบ ที่ไม่ได้ทำความสะอาดเป็นประจำ

ผลการตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง จำนวน 34 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็น ร้านอาหารริมทาง จำนวน 5 ตัวอย่าง ร้านขายเครื่องดื่ม จำนวน 7 ตัวอย่าง ร้านอาหารประเภทถึงน้ำดื่ม จำนวน 8 ตัวอย่าง และถึงเก็บขวดตูดิบจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาและมีความปลอดภัยน้อยที่สุด คือ น้ำแข็งร้านอาหารประเภทถึงน้ำดื่ม โดยจากจำนวน 9 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์จำนวน 8 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 88.0 % รองลงมาน้ำแข็งจากถึงเก็บขวดตูดิบ คิดเป็น 80.0% และจากร้านอาหารริมทาง คิดเป็น 62.4% ส่วนน้ำแข็งที่มีความปลอดภัยมากที่สุด คือ น้ำแข็งจากร้านขายเครื่องดื่ม โดยจากจำนวน 12 ตัวอย่าง ไม่ผ่านเกณฑ์ 7 ตัวอย่างหรือ คิดเป็น 58.0 % (ตารางที่ 4.9) จากการศึกษาพบว่าร้านอาหาร ส่วนใหญ่มีลักษณะร้านที่เปิดโล่ง มีถึงขยะบริเวณรอบร้าน หรือถึงเก็บน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบมีน้ำไหลบริเวณด้านใต้ของถัง มีการใช้ภาชนะถ้วยหรือชามในการตักน้ำแข็ง ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (ภาพที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเฉลี่ยและกลุ่มตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน เชื้อ *S. aureus* ในน้ำแข็งที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยา

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนร้านที่ไม่ผ่านเกณฑ์ (%)	Total plate count (cfu/ml)			ตรวจพบ <i>S.aureus</i> (%)
		ค่าน้อยที่สุด	ค่ามากที่สุด	ค่าเฉลี่ย	
ร้านอาหารริมทาง (n = 8)	5 (62.5 %)	4.7×10^1	3.3×10^3	720	1 (25.0%)
ร้านอาหาร (n = 9)	8 (88.0 %)	3.8×10^1	5.8×10^3	539	1 (11.0%)
ร้านขายเครื่องดื่ม (n = 12)	7 (58.0 %)	1.5×10^1	6.4×10^3	404	3 (25.0%)
ถังเก็บวัตถุดิบ (n = 5)	4 (80.0 %)	1.4×10^2	8.1×10^3	4765	1 (20.0 %)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

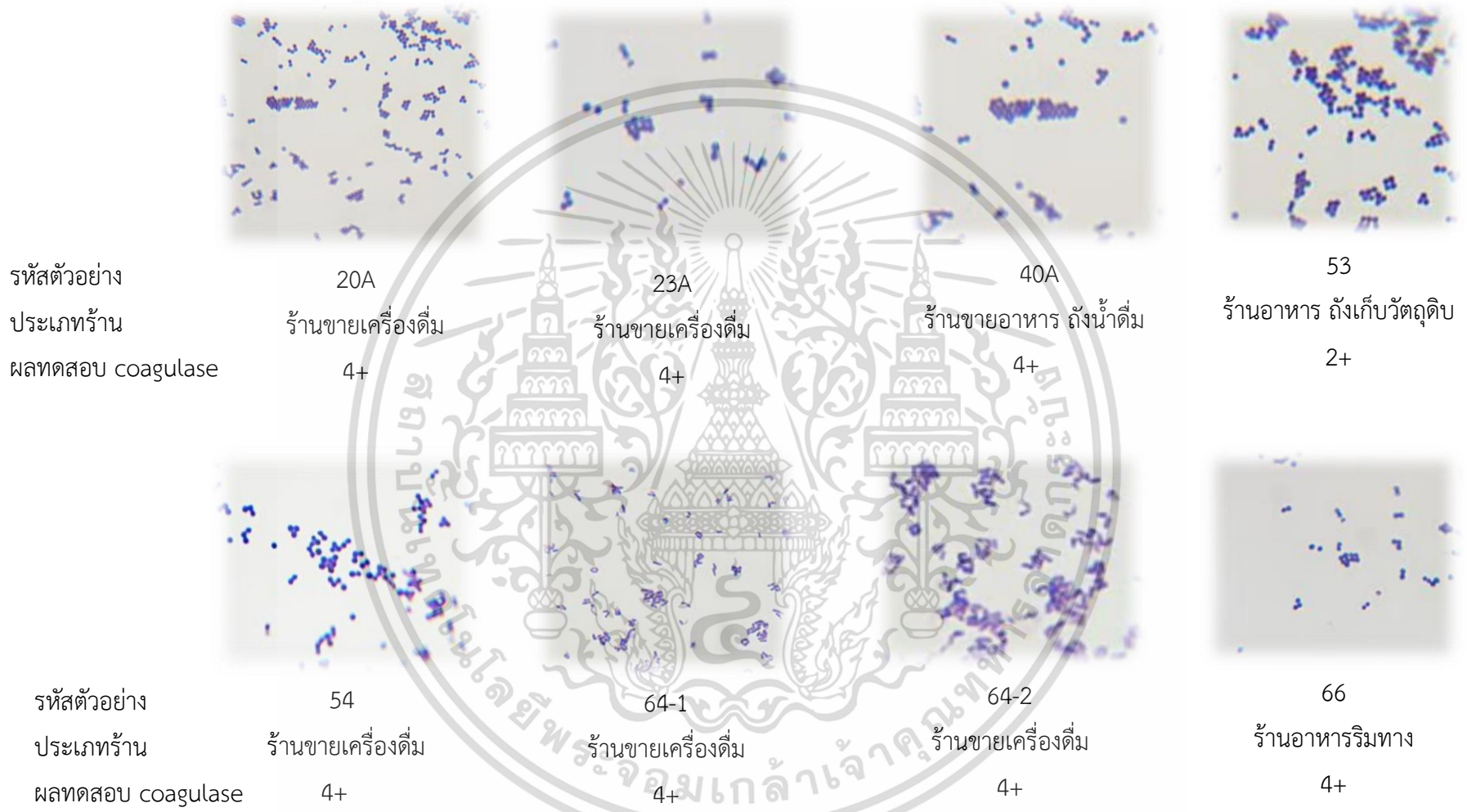
ภาพที่ 4.9 สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีของผู้จำหน่าย (ก) และการแช่ขวดน้ำหรือวัตถุติดกับน้ำแข็ง (ข) ในร้านอาหารประเภทถั่งน้ำดื่ม

จากการตรวจเชื้อ *S. aureus* ในน้ำแข็ง ตรวจพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) จากตัวอย่างที่ 20A, 23A, 40A, 53, 54, 64-1, 64-2 และ 66 จำนวน 8 โอลิโอเลท ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็งต่อไป

4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของของจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* ที่พบปนเปื้อนในน้ำแข็ง

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *S. aureus* จำนวน 8 โอลิโอเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง ทำการย้อมแกรมศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งทุกตัวอย่างเป็นแบคทีเรีย แกรมบวก ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet เซลล์มีรูปร่างกลม จับกันเป็นกลุ่มคล้ายรวงงุ่น (ภาพที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลทดสอบ coagulase ของ *S. aureus* ที่พบในตัวอย่างไม่ซ้ำ

4.5 ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในน้ำแข็ง โดยวิธีทางโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการวิเคราะห์ เชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอโดยชุดทดสอบ วัดค่าความเข้มข้นและค่าความบริสุทธิ์ ที่ค่าดูดกลืนแสง 260 และ 280 ศึกษาชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของเชื้อ *S. aureus* อ่างอิง และเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง มาตรวจสอบและระบุสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.5.1. ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง ที่สกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* อ่างอิง และ *S. aureus* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำแข็ง โดยสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit) ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ นำมาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ 260 และ 280 โดยไม่ได้ทำการเจือจาง (ตารางที่ 4.10) ผลการวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ ช่วงค่าอยู่ที่ประมาณ 5.61-31.52 ng/μl และ ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ ช่วงค่าอยู่ที่ประมาณ 1.4 – 1.9 นำดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการศึกษาชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 4.10 การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของดีเอ็นเอเชื้อ *S. aureus* อ่างอิง และ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็งที่พบการปนเปื้อน ที่สกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit)

ตัวอย่างเชื้อ <i>S. aureus</i>	A260	A280	ความบริสุทธิ์ (260/280)	ความเข้มข้น (ng/μl)
20A	0.1198	0.2133	1.514	5.99
23A	0.6303	0.4851	1.729	31.52
40A	0.3469	0.2128	1.763	17.35
54	0.3217	0.1754	1.388	16.09

64	0.3385	0.3385	1.92	16.93
66	0.2038	0.2038	1.905	10.19
AKL1034	0.6085	0.3290	1.960	30.46
AKL1039	0.1121	0.0797	1.761	5.61
ATC 6538	0.1677	0.1052	1.925	8.39

หมายเหตุ : การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ 260 และ 280 โดยไม่ได้ทำการเจือจาง

4.5.2 ผลการศึกษาชนิดของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

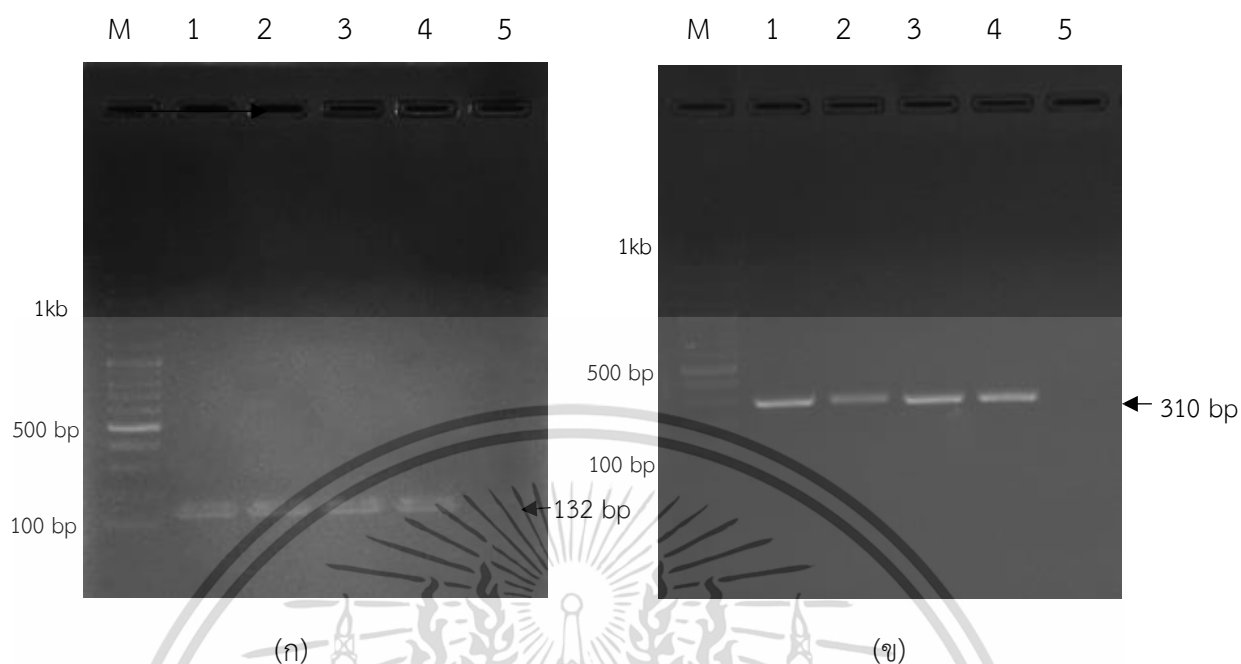
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตามขั้นตอน ในข้อ 3.5.4.2 เพื่อใช้ในการศึกษาชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อเชื้อ *S. aureus* โดยนำตัวอย่างเชื้อ *S. aureus* อ้างอิง (positive control) และ *S. aureus* จากตัวอย่างน้ำแข็ง 8 ไอโซเลท นำมาเปรียบเทียบผลของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง แบ่งตามลักษณะทางสายพันธุ์ของ *S. aureus* ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus*
2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ
3. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ

4.5.2.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus*

จากการศึกษาชนิดของไพรเมอร์ GFEMA nucA และ SAnucA เพื่อใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้ไพรเมอร์ GFEMA (ก) และ ไพรเมอร์ nucA (ข) โดยใช้ *S. aureus* เชื้ออ้างอิง (positive control) ที่เปรียบเทียบกับ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง lane M : marker ขนาด 100 bp ; lane 1-3 : *S. aureus* เชื้ออ้างอิง (สายพันธุ์ AKL1034, AKL1039, ATC6538) ; lane 4 : *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง (รหัสตัวอย่าง 64) ; lane 5 : negative control ที่ 2.0 % agarose gel, TAE buffer 1X, สภาวะในการรันเจล 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

จากภาพที่ 4.11 เป็นการพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus* โดยการตรวจพิสูจน์ยืนยัน femA และ nucA โดยใช้ไพรเมอร์ GFEMA และ nucA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เชื้ออ้างอิง และเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง จากการศึกษาตรวจพบยืนยัน femA มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 132 bp และ ยืนยัน nucA มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 310 bp และเมื่อใช้ไพรเมอร์ SAnucA ตรวจพบยืนยัน nucA มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 423 bp (ไม่แสดงภาพผลการทดลอง)

4.5.2.2 การศึกษาไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

จากการศึกษาลักษณะทางสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ไพรเมอร์ ตามตารางที่ 3.3 โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ไพรเมอร์ GMECA โดยใช้ *S. aureus* เชื้ออ้างอิง (positive control) ที่เปรียบเทียบและ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง lane M : marker ขนาด 100 bp ; lane 1-3 : *S. aureus* อ้างอิง (สายพันธุ์ AKL1034, AKL1039, ATC6538); lane 4 : *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง (ตัวอย่าง 64); lane 5 : negative control ที่ 2.0 % agarose gel ใน TAE buffer สภาวะในการรันเจล 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

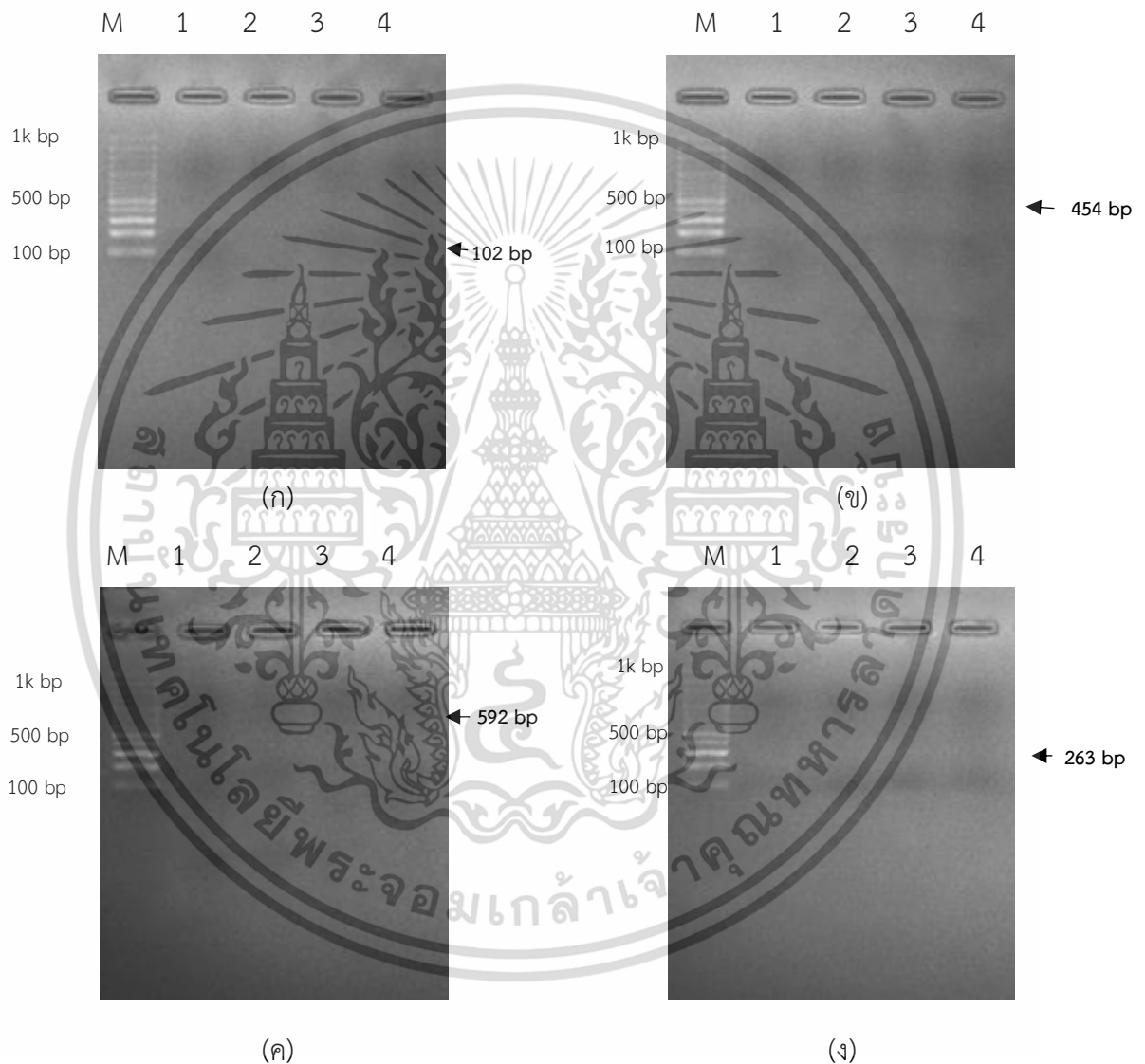
จากภาพที่ 4.12 เป็นการพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยการตรวจพิสูจน์ยืนยัน *mecA* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เชื้ออ้างอิงและเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง จากการศึกษาตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *mecA* แสดงว่า เชื้อ *S. aureus* ที่อ้างอิงและเชื้อที่เก็บจากตัวอย่างน้ำแข็งไม่ต้านต่อยาเมธิซิลิน หรือสภาวะในการทำพีซีอาร์ ไม่เหมาะสม จึงไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ที่ขนาด 163 bp (Wongboot et al., 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2.3 การศึกษาไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่สร้าง

สารพิษ

จากการศึกษาลักษณะทางสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.5 โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยใช้ไพรเมอร์ GSEA (ก), seb (ข), sec (ค), sed (ง) โดยใช้ *S. aureus* อ่างอิง (positive control) ที่เปรียบเทียบและ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง lane M : marker ขนาด 100 bp ; lane 1-2 : *S. aureus* อ่างอิง (สายพันธุ์ ATC1039, ATC6538); lane 4 : *S.*

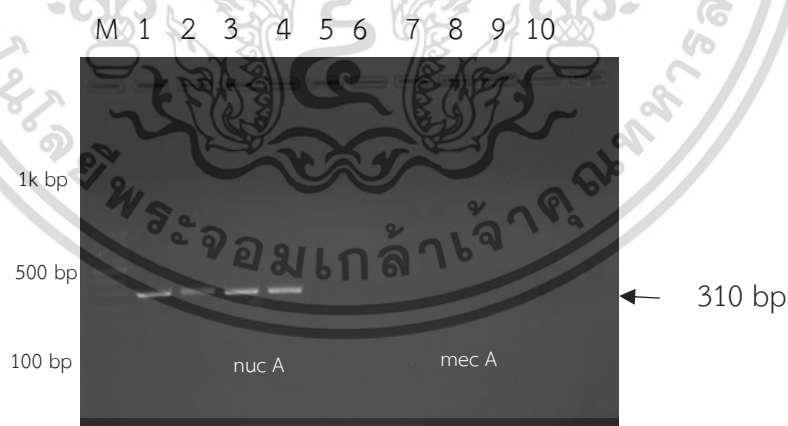
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aureus ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง (ตัวอย่าง 64); lane 5 : negative control ที่ 2.0 % agarose gel ใน TAE buffer สภาวะในการรันเจล 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

จากภาพที่ 4.13 เป็นการพิสูจน์ยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยการตรวจพิสูจน์ยืนยัน GSEA, SAseb, GSEC และ SASed ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เชื้ออ้างอิงและเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน GSEA, SAseb, GSEC และ SASed แสดงว่าเชื้อ *S. aureus* ที่อ้างอิงและเชื้อที่เก็บจากตัวอย่างน้ำแข็ง ไม่สร้างสารพิษหรือสภาวะในการทำพีซีอาร์ไม่เหมาะสม จึงไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 102, 592, 454 และ 263 bp (Mehrotra et al., 2000)

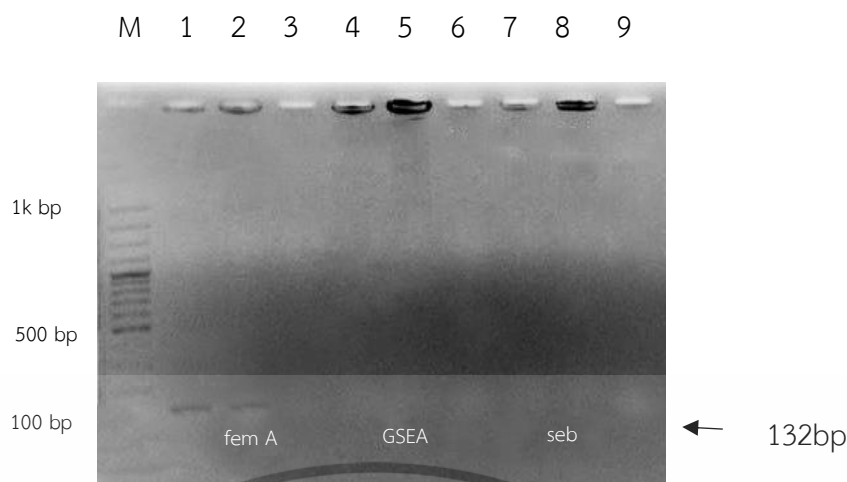
4.5.2.4 การตรวจสอบระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งที่เก็บจากร้านอาหารริมทาง

จากผลการศึกษานิตของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ SAnucA, มาใช้ในการทำพีซีอาร์เพื่อระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* ใช้ไพรเมอร์ GMECA เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ และใช้ไพรเมอร์ GSEA และ seb เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้สภาวะพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังภาพที่ 4.14 และ 4.15



ภาพที่ 4.14 แสดงผลผลิตพีซีอาร์โดยทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* และ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยใช้ไพรเมอร์ SAnucA และ GMECA (ก) ของ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง lane M : marker ขนาด 100 bp ; lane 1-4 และ 6-9 : *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง ตัวอย่างที่ 20A, 23A, 64 และ 66 lane 5 และ 10 : negative control ที่ agarose gel 1.8 % ใน TAE buffer สภาวะในการรันเจล 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เผยแพร่ให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* และ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยใช้ไพรเมอร์ GFEMA, GSEA และ seb ของ *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง lane M : marker ขนาด 100 bp ; lane 1-2, 4-5 และ 7-8 : *S. aureus* ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็งตัวอย่างที่ 20A และ 23A lane 3, 6 และ 9 : negative control ที่ agarose gel 1.8 % ใน TAE buffer สภาวะในการรันเจล 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

จากภาพที่ 4.14 และ 4.15 เป็นการพิสูจน์ยืนยันและระบุสายพันธุ์ของ *S. aureus* โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์ คือ GFEMA, SAnucA, mecA, GSEA และ seb ในการระบุสายพันธุ์ *S. aureus* ยืนยันสายพันธุ์ *S. aureus* ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษ โดยการตรวจพิสูจน์ยืนยัน femA และ nucA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง ตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน femA มีขนาดดีเอ็นเอ 132 bp และ nucA มีขนาดดีเอ็นเอ 310 bp จากการตรวจพิสูจน์ด้วยยีน mecA ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะและ ยีน ที่สร้างสารพิษ ชนิด A และ B ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน mecA, sea, seb โดยทำให้สามารถยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำแข็ง คือ เชื้อ *S. aureus* ที่ไม่ติดต่อยาปฏิชีวนะเมธิซิลินและไม่สร้างสารพิษ

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การสำรวจน้ำแข็งที่พบในร้านอาหารริมทาง ในเขตลาดกระบัง ประกอบด้วย น้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง 8 ร้าน ร้านขายเครื่องดื่ม 12 ร้าน และร้านอาหาร 14 ร้าน แบ่งออกเป็นน้ำแข็งจากถังน้ำดื่ม 9 ตัวอย่างและถังเก็บวัตถุดิบจากร้านอาหาร 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 34 ตัวอย่าง การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาน้ำแข็ง เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีจำนวนตัวอย่างที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานจำนวน 24 ตัวอย่างหรือคิดเป็นจำนวน 70.6 % โดยแบ่งออกเป็น ร้านอาหารริมทางจำนวน 5 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 20.8 % ร้านเครื่องดื่ม จำนวน 7 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 29.2 % ร้านอาหาร ประเภทถังน้ำดื่ม จำนวน 8 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 33.3 % และร้านอาหารประเภทถังเก็บวัตถุดิบจำนวน 4 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 16.7 %

จากการตรวจการปนเปื้อนจุลินทรีย์ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็ง พบการปนเปื้อนมากที่สุดจากร้านเครื่องดื่ม มีจำนวน 3 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 12 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 25 % จากร้านอาหารริมทาง จำนวน 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 4 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 25 % ร้านอาหารประเภทถังวัตถุดิบ จำนวน 1 ตัวอย่าง จาก 5 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 20 % และร้านอาหารประเภทถังน้ำดื่มจำนวน 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 9 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 11 %

จากการศึกษาผลของการสกัดดีเอ็นเอและไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. aureus* ได้ การทดลองใช้ไพรเมอร์ 3 กลุ่ม ในการระบุสายพันธุ์ *S. aureus* พบว่า ไพรเมอร์ GFEMA nucA และ SAnucA แสดงผลผลิตของพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *S. aureus* โดย GFEMA ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 132 bp ไพรเมอร์ nuc A ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 310 bp และ SAnucA ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 432 bp จากการทดลองไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุสายพันธุ์ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะเมธิซิลิน คือ ไพรเมอร์ mec A ไม่พบการแสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และการทดลองไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุสายพันธุ์ *S. aureus* ที่สร้างสารพิษแอนโทโรทอกซิน คือ ไพรเมอร์ GSEA, .seb, sec และ sed ไม่พบการแสดงผลผลิตพีซีอาร์

จึงสามารถสรุปได้ว่า ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* คือ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน femA และ nuc A *S. aureus* ที่แยกจากตัวอย่างน้ำแข็งไม่มีการสร้างสารพิษและไม่มีการติดต่อยาปฏิชีวนะเมธิซิลิน

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสุขลักษณะของร้านอาหารริมทาง การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งและการแยกระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการแยกและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ในน้ำแข็ง ซึ่งผลการวิจัยสามารถนำไปใช้ประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทางได้ แต่ขอบเขตของการศึกษานั้นยังไม่ครอบคลุมร้านอาหารและเครื่องดื่มทุกประเภทที่มีการใช้น้ำแข็ง และไม่ได้มีการกำหนดสัดส่วนของตัวอย่างน้ำแข็งในก่อนการตรวจสอบ ดังนั้นผลการวิจัยที่ได้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาของร้านขายอาหารริมทางและร้านขายน้ำดื่มบริเวณ เขตลาดกระบัง สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไปควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างอาหารที่ทำการตรวจสอบ และมีการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ก่อที่โรคอาหารเป็นพิษในตัวอย่างน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทางเพิ่มเติม ได้แก่ *Salmonella* spp. *Enterococcus* spp. *E. coli*, *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นต้น

จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าน้ำแข็งจากร้านอาหารริมทางและร้านเครื่องดื่ม ที่นำมาตรวจไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุขเป็นจำนวนมาก เป็นสัญญาณที่ทำให้ตระหนักว่าถึงเวลาที่เจ้าหน้าที่ ผู้เกี่ยวข้องจะต้องดำเนินการเรื่องความสะอาด ปลอดภัยของน้ำแข็งสำหรับบริโภคจากร้านเครื่องดื่ม มีมาตรการป้องกันการปนเปื้อนโดยการมุ่งเน้นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำแข็งสำหรับบริโภคในเครื่องดื่ม คุณภาพทางจุลชีววิทยาของน้ำแข็งที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ สุขอนามัยของผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสน้ำแข็งคุณภาพน้ำที่ใช้ผลิตน้ำแข็ง สุขลักษณะของโรงงานผลิตน้ำแข็ง อุปกรณ์ตักน้ำแข็ง อุปกรณ์เก็บรักษาน้ำแข็ง วิธีเก็บรักษาน้ำแข็ง และการขนส่ง เป็นต้น

จากการดำเนินงานวิจัยพบว่าการปนเปื้อนจุลินทรีย์ *S. aureus* ในตัวอย่างน้ำแข็ง ข้อเสนอแนะทางในการจัดการลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ *S. aureus* ไว้โดยสังเขป ดังนี้

1) ด้านสถานที่

- ควรดูแลรักษาสุขลักษณะบริเวณรอบด้านของร้าน ในร้านที่มีลักษณะเปิดโล่งควรหมั่นทำความสะอาดเป็นประจำ เนื่องจากมีลักษณะเปิดโล่งทำให้มีมลภาวะอากาศจากภายนอกเข้ามายังในร้านได้ ทำให้เกิดฝุ่นละอองมาก เกิดเป็นแหล่งสะสมของแบคทีเรีย
- ในร้านที่มีลักษณะปิด ควรทำความสะอาดเครื่องปรับอากาศเป็นประจำ ไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของฝุ่นและแบคทีเรีย
- และควรเช็ดทำความสะอาดภายในร้านเป็นประจำด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรค

2) ด้านภาชนะถึงใส่น้ำแข็ง

- ควรทำความสะอาดถึงใส่น้ำแข็งเป็นประจำทุกวัน ไม่ควรรอจนน้ำแข็งละลายหมดจึงล้างทำความสะอาด
- ควรเปลี่ยนน้ำแข็งภายในถึงน้ำแข็งทุกวัน
- ไม่ควรตั้งถังขยะ หรือ อุปกรณ์ต่างๆ ไว้บริเวณใกล้เคียงถึงใส่น้ำแข็ง
- ถึงน้ำแข็งสำหรับบริโภคไม่ควรที่จะใส่ขวดน้ำหรือวัตถุติดกับน้ำแข็ง
- ลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้ในการตักน้ำแข็งควรเป็น สเตนเลสไม่ผสมเหล็กมีด้ามจับ ไม่ควรใช้ขามหรืออุปกรณ์ในการประกอบอาหารมาใช้ในการตักน้ำแข็ง และ ควรมีที่วางที่ตักน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากบริเวณด้ามจับปนเปื้อนน้ำแข็ง
- น้ำบริเวณใต้ถังควรปล่อยทิ้งทุกวัน เพื่อไม่ให้เป็นที่สะสมของจุลินทรีย์

3) บุคลากร

- ผู้ประกอบการควรมีสุนัขลักษณะส่วนบุคคล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการล้างมือให้สะอาดอย่างถูกวิธี ดูแลตัวเองเมื่อเจ็บป่วย และหากมีบาดแผลต้องปิดพลาสติกเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่อาหาร
- ผู้ประกอบการควรมีสุนัขลักษณะที่ดีในการปรุงและจัดจำหน่ายอาหาร ได้แก่ สวมหมวกคลุมผม ผ้าปิดปาก ถุงมือ และผ้ากันเปื้อน ไม่ใช้มือสัมผัสอาหารโดยตรง โดยยึดหลักว่าต้องทำให้อาหารสะอาด ปลอดภัย ปราศจากการปนเปื้อนทุกขั้นตอนของการปรุงและจัดจำหน่าย โดยคำนึงถึงสุขภาพของผู้บริโภคเป็นสำคัญ
- ฝึกอบรมให้ความรู้ เกี่ยวกับอันตรายและจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในน้ำแข็ง หรืออาหาร เจ้าหน้าที่หรือบุคลากรที่เกี่ยวข้องควรหมั่นตรวจสอบคุณภาพของน้ำแข็งอย่างสม่ำเสมอ เพื่อกระตุ้นให้ผู้ประกอบการตระหนักถึงความสำคัญของคุณภาพของน้ำแข็ง เพื่อประโยชน์และความมั่นใจของผู้บริโภคและสังคมส่วนรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ชี้ชวาล สิงห์กันต์. 2018.อันตรายที่มากับน้ำแข็งปนเปื้อน กฎหมายที่เกี่ยวข้องและการสุขาภิบาล. วารสารกฎหมายสุขภาพและสาธารณสุข. 2 : 279-293.
- ประภาวดี ดิษยาธิคม.2524. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเชื้อที่ก่อโรค [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info id=210. 18 พฤษภาคม 2563.
- ปิยะนุช จงสมัคร, จุรีย์ เจริญธีรบูรณ์, สุนีย์ เตชะอาภรณ์กุล. 2557. การสำรวจความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ของน้ำแข็งบริโภคที่จำหน่ายในโรงอาหารและตลาดนัด มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์.รายงานการศึกษาค้นคว้าอิสระ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม.
- มาหามะซูปยัน แดเป๊าะ,สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาจ,เบญจพร ศรีสุวรรณาศ และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์.2561. การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในใบมะขามแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันโดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์. (3)2 : 42-55.
- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2558. บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สำนักสุขาภิบาลอาหารและน้ำ กรมอนามัย. 2563. คู่มือข้อกำหนดด้านสุขาภิบาลอาหาร สำหรับแผงลอยจำหน่ายอาหาร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://foodsafety.anamai.moph.go.th/main>. 20 พฤษภาคม 2563.
- อนุสรณ์ เป่าสูงเนิน, สาริการ์ ลาจำนงค์, สุชาวดี ฉิมกุล, สุวรินทร์ ก้องเมือง และ วัลลภ ภิญโยวงษ์. 2560. การปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียในน้ำแข็งและสภาพสุขาภิบาลร้านค้าขายปลีกร้านขายเครื่องดื่ม บริเวณด้านหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.วารสารชาชนันท์. 1(1): 10-18.
- Simopoulos, A. P. and Bhat, R.V.(eds). 2000. Street Foods. India. Karger Publishers.
- Azizkhani, M. and Tooryan, F. 2018. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in pastry cream products sold in Amol (Iran). Iranian Journal of Veterinary Medicine. 12(2): 167-173.
- BAM. 2001. BAM Chapter 3: Aerobic Plate Count. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>. 30 May 2020
- BAM. 2016. BAMChapter12: *Staphylococcus aureus*. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus> 30 May 2020

- Gibthai training center. 2018. ความรู้พื้นฐานเทคนิคพีซีอาร์. [ออนไลน์]: เข้าถึงได้จาก https://www.gibthai.com/service/note_detail/12. 27 พฤษภาคม 2563
- Hampikyan H., Bingol E., Cetin O. and Colak H. 2017. Microbiological quality of ice and ice machines used in food establishments. *Journal of Water and Health*. 15(3): 410-417.
- Mako S., Harrison M., Sharma V. and Kong F. 2014. Microbiological quality of packaged ice from various sources in Georgia. *Journal of Food Protection*. 77: 1546-1553.
- Manisha M., and Wang, G., and Wendy, M., 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 3(38): 1032-1035.
- Settanni L., Gaglio R., Stucchi C., Martino S. D., Francesca N. and Moschetti G. 2017. Presence of pathogenic bacteria in ice cubes and evaluation of their survival in different systems. *Ann Microbiol* 67: 827-835
- Suganya, G., Porteen K., Sonuwara, B. and Jagadeesh, A. 2018. Prevalence and molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pet dogs. *The Pharma Innovation Journal*. 7(3): 719-722.
- Wongboot, W., Chomvarin, C., Engchanil, C., Chaimanee, P. 2013. Multiplex PCR for detection of superantigenic toxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients and carriers of a hospital in northeast Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 44(4):660-671.
- World Health Organization (WHO).1997. Guidelines for drinking-water quality. [Online]. Available: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwqvol32ed.pdf?ua=1



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 น้ำแข็งจากร้านอาหารริมทาง และ ประเภทอาหารที่จำหน่าย

ตัวอย่างที่	สถานที่	ประเภทอาหาร
12	ร้านขายน้ำแดงโมปั่น ถนนคนเดิน สจล.	น้ำแดงโมปั่น
14	ร้านขายน้ำ ซอยจินดา ลาดกระบัง	น้ำปั่น , น้ำผลไม้ปั่น
15	ศูนย์อาหารรินทอง ถนนรามคำแหง	ศูนย์อาหาร
18	ร้านขายน้ำตาลสด ถนนคนเดิน สจล.	น้ำตาลสด
20A	ร้านเครื่องดื่มหน้า ท็อป ลาดกระบัง	ร้านขายกาแฟโบราณ
66	ร้านผลไม้ปั่น ถนนคนเดิน	น้ำผลไม้ปั่น
67	ร้านน้ำตาลสด-น้ำอ้อย	น้ำตาลและน้ำอ้อย
71	ร้านขายเครื่องดื่ม หน้าโรงเรียนวัดปลูกศรัทธา	น้ำอัดลม

ตารางที่ ก.2 น้ำแข็งจากตัวอย่างร้านขายเครื่องดื่ม และ ประเภทอาหารที่จำหน่าย

ตัวอย่างที่	สถานที่	ประเภทอาหาร
21A	เดอะการ์เด้น คอฟฟี่@ลาดกระบัง	ขายน้ำแบบชง
23A	ร้านน้ำเจ้าคุณทหาร	ขายน้ำแบบชง
31A	ร้านกาแฟ O-coffee	ขายน้ำแบบชง
39A	กาแฟพันธุ์ไทย	ขายน้ำแบบชง
54	ร้านกาแฟรุ่นโหล	ขายน้ำแบบชง
55	ร้านน้ำหอมมิไอซ์	ขายน้ำแบบตักใส่แก้ว
56	ร้าน ซิลล์มิลค์	ขายน้ำแบบชง
57	เพ็ญกาแฟโบราณ	ขายน้ำแบบตักใส่แก้ว
60	ร้านน้ำ Annie shake	ขายน้ำแบบชง
63	ดีดี กาแฟหญ้าหวาน	ขายน้ำแบบชง
64	BAAN Cool Café	ขายน้ำแบบชง
65	ร้านสุขใจก้วยเตี่ยว	อาหาร-ก้วยเตี่ยว-ขายน้ำแบบชง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.3 น้ำแข็งจากตัวอย่างร้านอาหาร ประเภทถ้ำน้ำดื่ม และ ประเภทอาหารที่จำหน่าย

ตัวอย่างที่	สถานที่	คุณภาพ
13	ครัวสุรินทร์	อาหารตามสั่ง-ก๋วยเตี๋ยว
33A	ลาบอุบล (ถ้ำน้ำดื่ม)	ส้มตำ อาหารอีสาน
40A	ก๋วยเตี๋ยว ป.ปลา	ก๋วยเตี๋ยวต้มยำ
38A	ก๋วยเตี่ยวอ้นดาฟ้าใส (ถ้ำน้ำดื่ม)	ก๋วยเตี่ยว
51-1	ก๋วยเตี่ยวไก่เมธิ (ถ้ำน้ำดื่ม)	ก๋วยเตี่ยวไก่
52	ร้านข้าวแกงบ้านคุณย่า	ข้าวราดแกง
59	ฟลุ๊คพะหมี่เกี๊ยว (ถ้ำน้ำดื่ม)	ก๋วยเตี่ยวหมูแดง
69	คน 8 หน้า	อาหารญี่ปุ่น
70	อาลอง ต้มเลือดหมู	ร้านอาหารตามสั่ง

ตารางที่ ก.4 น้ำแข็งจากตัวอย่างร้านอาหาร ประเภทถ้ำเก็บวัตถุดิบ และ ประเภทอาหารที่จำหน่าย

ตัวอย่างที่	สถานที่	คุณภาพ
30A	ก๋วยเตี่ยวเรือคุณ อ (ถ้ำวัตถุดิบ)	ก๋วยเตี่ยว
34 A	ลาบอุบล (ถ้ำวัตถุดิบ)	ส้มตำ อาหารอีสาน
51-1	ก๋วยเตี่ยวไก่เมธิ (ถ้ำวัตถุดิบ)	ก๋วยเตี่ยวไก่
53	ข้าวแกงป่ากับลุง	ข้าวราดแกง
58	ฟลุ๊คพะหมี่เกี๊ยว (ถ้ำวัตถุดิบ)	ก๋วยเตี่ยวหมูแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองและวิธีการเตรียม

ข.1.1 Baird-Parker (BP) medium

- base medium

Baird-Parker (BP) medium	67	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งส่วนผสมทั้งหมด ละลายให้เข้ากันลงในพลาสติก ปิดจุกแล้วฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- สารละลาย 1% Potassium tellurite

Potassium tellurite	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Potassium tellurite ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดที่ปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

- Egg yolk - tellurite emulsion

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ใน 70 % alcohol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดดูเรน ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85 % ที่ผ่านจากฆ่าเชื้อแล้ว ผสมในอัตราส่วนน้ำเกลือ 0.85 % 7 ส่วน + ไข่แดง 3 ส่วน จากนั้นนำ Egg yolk emulsion ที่ได้จำนวน 200 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 1 % Potassium tellurite ที่กรองปลอดเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตร ปิดฝาเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำอาหาร Baird-Parker base medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมา 235 มิลลิลิตร เติม Egg yolk - tellurite emulsion ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันระวังฟองอากาศ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ข.1.2 Brain heart infusion (BHI) broth

Brain heart infusion (BHI)	37	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.1.3 Rabbit plasma

ละลาย Rabbit plasma 1 ขวด ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 มิลลิลิตร ปิเปตใส่หลอดปลอดเชื้อ หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด

ข.1.4 Trypticase soy agar (TSA)

Trypticase Peptone (Tryptic)	15	กรัม
NaCl	5	กรัม
Phytone Peptone (Soytone)	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างหรือพีเอช ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดหรือขวด ปิดจุกให้สนิท จากนั้นนำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.1.5 Trypticase soy broth (TSB)

Trypticase Peptone (Tryptic)	15	กรัม
NaCl	5	กรัม
Phytone Peptone (Soytone)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอช ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดหรือขวด ปิดจุกให้สนิท จากนั้นนำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.1.6 Plate count agar(PCA)

ซึ่งสารอาหารเลี้ยง PCA สำเร็จรูป จำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จำนวน 1,000 มิลลิลิตร ต้มเดือดจนผงวุ้นละลายดี แบ่งบรรจุใส่ในขวดดูแรน และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.2 การเตรียมสารเคมี

ข.2.1 Butterfield 's phosphate-buffered

- การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บในตู้เย็น

- การเตรียมDilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ตวงใส่ขวดปริมาตร 450 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 กรัม) หรือตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) และดูด 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร นำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.2.2 Gram crystal violet

- Solution A(Stock)

Crystal violet (90% dry content)	2	กรัม
95% Ethanol	20	มิลลิลิตร

ข.2.3 Gram iodine

Iodine	2	กรัม
Potassium Iodide (KI)	4	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodide แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมด เก็บในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.4 Gram safranin O

Safranin O	0.25	กรัม
95% Ethanol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ละลายสีใน ethanol (กวนด้วยแท่งแก้ว)แล้วเติมน้ำกลั่นกรองก่อนใช้

ข.2.5 Normal saline (0.85 % NaCl)

Sodium chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายให้เข้ากันนำเข้ามาเชื้อใน autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15

นาที



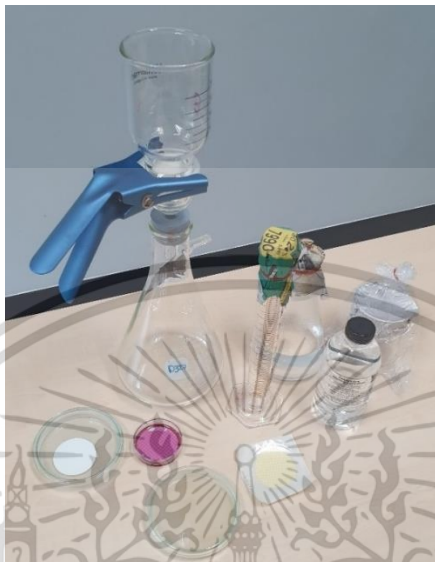
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ค
ผลการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.1 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำแข็ง



ภาพที่ ค.1 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองจุลินทรีย์ในตัวอย่างน้ำแข็ง

ค.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด



ภาพที่ ค.2 การเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหาร PCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ *S. aureus*



ภาพที่ ค.3 การเจริญของ *S. aureus*
บนอาหาร Baird-Parker (BP)
medium

ภาพที่ ค.4 การสร้างเอนไซม์
coagulase ของ
S. aureus ใน rabbit plasma

ภาพที่ ค.5 การศึกษาลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาของ *S. aureus* ด้วย
การย้อมแกรม (gram staining)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายธนภัทร สีหมนตรี
วัน เดือน ปี เกิด	2 ธันวาคม 2540
ประวัติการศึกษา	ระดับอนุบาล - โรงเรียนอนุบาลนิจจานุเคราะห์ ระดับประถมศึกษา - โรงเรียนเซนต์ปอลหนองคาย ระดับมัธยมศึกษา - โรงเรียนปทุมเทพวิทยาคาร - โรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) ระดับปริญญาตรี - คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	นักศึกษาฝึกงานที่ CPF FOOD & BEVERAGE CO.,LTD. ซอส พรีเม็กซ์ เครื่องปรุง นักศึกษาช่วยงานวิจัยในโครงการวิจัย เรื่อง Microbiological quality of ice sold in Thailand ภายใต้ KMITL Research Funding: Academic Melting Pot Fiscal Year 2020
ชื่อ-นามสกุล	นายอภิชาติ อัครวิเศษศิระกุล
วัน เดือน ปี เกิด	27 มีนาคม 2541
ประวัติการศึกษา	ระดับอนุบาล - โรงเรียนคริสเตียนธนบุรี ระดับประถมศึกษา - โรงเรียนวัดประยุรวงศาวาส ระดับมัธยมศึกษา - โรงเรียนเทพศิรินทร์ ระดับปริญญาตรี - คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	นักศึกษาฝึกงานที่ สถาบันรับรองมาตรฐาน ไอ.เอส.ไอ (MASCI) นักศึกษาช่วยงานวิจัยในโครงการวิจัย เรื่อง Microbiological quality of ice sold in Thailand ภายใต้ KMITL Research Funding: Academic Melting Pot Fiscal Year 2020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้