

การประเมินและการจัดการความเสี่ยงของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

นางสาวพรณิดา เตชะหุริจิตรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF *Listeria* spp. IN
COOKED FROZEN CHICKEN MEAT PRODUCT

Miss Punnida Techaruwichit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินและการจัดการความเสี่ยงของ <i>Listeria</i> spp. ใน ผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง
โดย	นางสาวพรณิดา เตชะหริวิจิตร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.มงคล เวสารัชเวศย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.มงคล เวสารัชเวศย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิจชัยวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(คุณอรรถกร ใจโพน)

พรรณนิดา เตชะหฐวิจิตร : การประเมินและการจัดการความเสี่ยงของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง. (RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF *Listeria* spp. IN COOKED FROZEN CHICKEN MEAT PRODUCT) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กীরติพิบูล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. มงคล เวสวัชเวศย์, 120 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงโดยศึกษาแหล่งที่มาและเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในกระบวนการผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา และหาแนวทางการควบคุมและจัดการความเสี่ยง เพื่อลดการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย งานวิจัยเริ่มจากการศึกษารูปแบบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. พบว่าบริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่พบเชื้อมากที่สุดคือ สายพานลำเลียงของเครื่องหั่น จึงได้มีการสื่อสารกับผู้ที่เกี่ยวข้องในการล้างสายพานให้มีประสิทธิภาพ แต่หลังการจัดการก็ยังคงพบ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ จึงได้นำวิธีทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ในการตรวจสอบแหล่งที่มาของการปนเปื้อน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) โดยเริ่มจากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้คัดเลือกไพรเมอร์ 4 ชนิดจาก 14 ชนิด จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของ *L. innocua* ได้ดีคือ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ Universal forward sequencing primer (UFS) ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดคือ 5 ng/μl จากนั้นจึงตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี RAPD แล้วประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อม พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. รวม 415 ตัวอย่าง พบ *L. innocua* 82.3%, *L. welshimeri* 11.2%, *L. seeligeri* 5.5% และ *L. monocytogenes* 1% เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* spp. พบ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1, *L. welshimeri* สายพันธุ์ LW 1.5 และ *L. seeligeri* สายพันธุ์ LS 1 ในผลิตภัณฑ์ โดยพบ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1 ดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง และพบแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือ ท่อระบายก๊าซ N₂ ของเครื่อง Liquid N₂ chiller, สายพานลำเลียงของเครื่องตรวจจับโลหะ และท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงได้มีการทบทวนวิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ และนำไปปฏิบัติใช้อย่างเข้มงวด เพื่อลดและกำจัดความเสี่ยงของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2553..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072653023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : RISK ASSESSMENT / *Listeria* spp. / CHICKEN MEAT / RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA

PUNNIDA TECHARUWICHIT : RISK ASSESSMENT AND MANAGEMENT OF *Listeria* spp. IN COOKED FROZEN CHICKEN MEAT PRODUCT. THESIS
 ADVISOR : ASSOC. PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., THESIS CO-
 ADVISOR : MONGKOL VESARATCHAVEST, Ph.D., 120 pp.

This study aimed to assess the risk by investigating the sources and the routes of *Listeria* spp. contamination in cooked frozen chicken meat process by the use of molecular typing method and manage the risk to reduce the contamination of *Listeria* spp. in finished product. Contamination profile of *Listeria* spp. was studied. By evaluating the samples of chicken meat product and environmental swab samples, it was found that the transferring conveyor belt of dicer had the highest frequency of *Listeria* spp. contamination. Communication between all stakeholders was carried out to improve the effectiveness of cleaning and sanitizing of the conveyor. However, the presence of *Listeria* spp. was still found on the products. Hence, molecular typing method was used to investigate the sources and routes of contamination. The optimum condition of a random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting method was developed to differentiate *Listeria* spp.. A total of 14 arbitrary primers were screened to obtain the appropriate 4 primers. Once the step of primer identification was accomplished, determination of the appropriate concentration of DNA template was also necessary for optimal discriminatory power. The selected primers were OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 and universal forward sequencing primer (UFS) and the concentration of DNA template for these primers used in this study was 5 ng/μl. A total of 415 *Listeria* contaminated samples were identified by conventional method and further subjected to the RAPD analysis to evaluate a relationship of the contamination in product and environment. The identified species were: *L. innocua* (82.3%), *L. welshimeri* (11.2%), *L. seeligeri* (5.5%) and *L. monocytogenes* (1%). By applying RAPD fingerprinting, *L. innocua* type LI 1.1, *L. welshimeri* type LW 1.5 and *L. seeligeri* type LS 1 were found in product. *L. innocua* type LI 1.1 remained persistently in the environment throughout the sampling period. The most frequently recovered surfaces of the microorganisms were the exhaust pipe of liquid N₂ chiller, conveyor belt of metal detector and drain of freezer. Therefore, the cleaning and sanitizing procedures were revised and strictly implemented to reduce and eliminate the risk of *Listeria* contamination in the cooked frozen chicken meat process.

Department : FOOD TECHNOLOGY..... Student's Signature

Field of Study : FOOD TECHNOLOGY..... Advisor's Signature

Academic Year :2010..... Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ก็ด้วยความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กীরติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร. มงคล เวสารัชเวศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินงานวิจัยมา โดยตลอด

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และคุณอรรรถร ใจโชน ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์รุจเวทย์ ทหารแก้ว ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้ห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณมงคล วงศ์ปัญญา คุณสุรีย์ มีทอง และคุณดารณี ศรีสิทธินาม ที่ให้ความช่วยเหลือและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยมาโดยตลอด

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการนำร่องภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และธนาคารกสิกรไทย จำกัด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 <i>Listeria</i> spp.	4
2.2 โรค Listeriosis.....	6
2.3 การปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp.	13
2.3.1 การปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp. ในสิ่งแวดล้อม.....	13
2.3.2 การปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	15
2.4 การควบคุมและยับยั้ง (Inactivation) <i>Listeria</i>	22
2.5 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกส่งออก.....	23
2.6 ทฤษฎีและหลักการของปฏิกิริยาดีเอ็นเอแบบสุ่ม.....	25
2.7 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD).....	32
2.8 การประเมินความเสี่ยง.....	35
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	44
3.1 วัตถุประสงค์.....	44
3.2 วัสดุและอุปกรณ์.....	44
3.3 สารเคมี.....	45

บทที่	หน้า
3.4 วิธีทดลอง.....	46
3.4.1 ศึกษากระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	46
3.4.2 หาความชุกของการปนเปื้อน <i>Listeria</i> spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต.....	46
3.4.3 หาความชุกของการปนเปื้อน <i>Listeria</i> spp. บริเวณพื้นผิวของ สิ่งแวดล้อมในส่วนหลังการปรุงสุก.....	47
3.4.4 หาสมภาวะที่เหมาะสมของปฏิริยาอุทไคโพลีเมอเรสแบบสุ่มในการ จำแนก <i>Listeria</i> spp.	49
3.4.5 ประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> spp. ใน ผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อม.....	53
3.4.6 เสนอวิธีการสำหรับจัดการความเสี่ยง.....	53
4 ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปรายผล.....	54
4.1 การศึกษารูปแบบการปนเปื้อน (Contamination profile) ของ <i>Listeria</i> spp. ก่อนการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา.....	54
4.2 การศึกษาสมภาวะที่เหมาะสมของปฏิริยาอุทไคโพลีเมอเรสแบบสุ่ม.....	58
4.3 การจำแนกการปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> ระดับชนิด (species) ในผลิตภัณฑ์และ สิ่งแวดล้อม.....	69
4.4 ความชุกของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆในระดับสายพันธุ์.....	75
4.5 การประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ <i>Listeria</i> ในระดับสายพันธุ์ ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม.....	90
4.6 การจัดการความเสี่ยง.....	94
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	97
รายการอ้างอิง.....	100
ภาคผนวก.....	113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	119

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปัจจัยที่จำกัดการเติบโตของ <i>Listeria</i> spp.	4
2.2 ลักษณะที่จำแนกชนิดของ <i>Listeria</i>	5
2.3 Serotype และการเกิดโรคในหนูของ <i>Listeria</i> ชนิด (species) ต่างๆ.....	6
2.4 จำนวนครั้งของเหตุการณ์ระบาดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจากอาหาร จำนวนผู้ป่วย และจำนวนผู้เสียชีวิตที่ได้รับรายงานในสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1998-2002....	7
2.5 จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ขณะที่อยู่ในภาวะของการป่วยต่างๆ.....	11
2.6 ตัวอย่างเหตุการณ์ระบาดของ <i>L. monocytogenes</i> ที่สำคัญในปี 1985-2008	12
2.7 การพบ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆในตัวอย่างข้าวโพด ฟาง และหญ้าหมักสำหรับเลี้ยงสัตว์จำนวน 210 ตัวอย่าง.....	13
2.8 การพบ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การผลิต 378 ตัวอย่างในโรงงานผลิตนม.....	13
2.9 การพบ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมภายในบริเวณการผลิต จำนวน 552 ตัวอย่าง.....	14
2.10 การพบ <i>L. monocytogenes</i> ในเนื้อหมูและวัวดิบ.....	16
2.11 การพบ <i>L. monocytogenes</i> ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูและวัว.....	16
2.12 การพบ <i>L. monocytogenes</i> ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก.....	17
2.13 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกเพื่อการส่งออก.....	24
2.14 การจำแนก <i>L. monocytogenes</i> 35 สายพันธุ์โดยเทคนิค serotype, zymotype, RAPD, PFGE และ ribotype.....	33
2.15 ตัวอย่างแบบจำลองความสัมพันธ์ของการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับ <i>L. monocytogenes</i>	39
2.16 จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อประชากร 10 ล้านคนต่อปี และจำนวนผู้ป่วยต่อหน่วยบริโภค 1 ล้านหน่วยของตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค 4 ชนิด.....	43
3.1 จุดเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์.....	48

ตารางที่	หน้า
3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ.....	51
4.1 ความชุกของ <i>Listeria</i> spp. ณ บริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆ.....	55
4.2 ความชุกของ <i>Listeria</i> spp. หลังการจัดการความเสี่ยงในเดือนกุมภาพันธ์ 2552.....	57
4.3 จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสของตัวอย่าง <i>Listeria</i> ที่ใช้ทดสอบ ไพรเมอร์ต่างๆ.....	61
4.4 ผลการจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> ด้วยวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping).....	65
4.5 ความชุกของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆ แบ่งตามรอบการทำงาน.....	70
4.6 ความชุกและชนิดของ <i>Listeria</i> ที่พบในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุง สุกแช่เยือกแข็ง.....	72
4.7 ความชุกของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่ง ตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	73
4.8 ความชุกและสายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i> ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่ เยือกแข็ง.....	77
4.9 ความชุกของ <i>L. innocua</i> สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการ ผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	78
4.10 หมายเลขกำกับแหล่งที่พบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ในแผนผังแสดงพื้นที่ของบริเวณ การผลิต.....	81
4.11 ความชุกและสายพันธุ์ของ <i>L. welshimeri</i> ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุก แช่เยือกแข็ง.....	84
4.12 ความชุกของ <i>L. welshimeri</i> สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณ การผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง.....	85
4.13 <i>L. monocytogenes</i> ที่พบ 4 ตัวอย่าง จำแนกในระดับสายพันธุ์.....	89
4.14 การพบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมต่างๆในวันที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ พบการปนเปื้อนหรือวันที่ใกล้เคียง.....	91
4.15 การพบ <i>L. innocua</i> ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกของเครื่อง liquid N ₂ chiller.....	92
4.16 ความชุกของ <i>Listeria</i> สายพันธุ์ต่างๆที่พบในสิ่งแวดล้อมของการผลิตหลังการ จัดการความเสี่ยง.....	95

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.2 ภาพจำลองการบุกรุกเข้าสู่เซลล์และภาพถ่าย electron micrographs ของ <i>L. monocytogenes</i>	9
2.3 เส้นทางการปนเปื้อนของ <i>L. monocytogenes</i> ระหว่างสิ่งแวดล้อม สัตว์ อาหาร และคน.....	15
2.4 ภาพถ่าย SEM ของ <i>L. monocytogenes</i> เกิดเป็นไบโอฟิล์มในร่องบนผิวสแตนเลส..	18
2.5 ตัวอย่างการแบ่งพื้นผิวสิ่งแวดล้อมการผลิตออกเป็นโซนต่างๆ.....	21
2.6 ขั้นตอนการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	26
2.7 รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	27
2.8 ผลผลิต RAPD-PCR ของ <i>L. monocytogenes</i> ที่วิเคราะห์ด้วย หลักการ gel electrophoresis.....	31
2.9 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของโอกาสในการเจ็บป่วยกับปริมาณเชื้อที่ได้รับ ในงานวิจัยต่างๆ โดยประเมินจากข้อมูลเชิงระบาดวิทยาและประสบการณ์จาก ผู้เชี่ยวชาญ.....	41
3.1 แผนผังการแบ่งโซนของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต.....	47
4.1 ความชุกของ <i>Listeria</i> spp. ณ บริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ก่อนการใช้วิธีทางอณู ชีววิทยา.....	55
4.2 ความชุกของ <i>Listeria</i> spp. ในผลิตภัณฑ์ ตั้งแต่เดือนมค. – ตค. 2552 ก่อนการใช้ วิธีทางอณูชีววิทยา.....	57
4.3 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. innocua</i> 15 ตัวอย่าง สำหรับใช้ใน การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์.....	58
4.4 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. welshimeri</i> 7 ตัวอย่าง สำหรับใช้ใน การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์.....	59
4.5 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง <i>L. seeligeri</i> 10 ตัวอย่าง สำหรับใช้ใน การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์.....	59

ภาพที่	หน้า
4.6 ภาพ Gel electrophoresis ของ <i>Listeria</i> ชนิดต่างๆ 10 ตัวอย่าง จากไพรมเมอร์ (a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS.....	62
4.7 ภาพ Gel electrophoresis ที่แต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ <i>L. innocua</i> จากไพรมเมอร์ (a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS..	64
4.8 ผลการจำแนกสายพันธุ์ <i>Listeria</i> ด้วยวิธี RAPD (4 ไพรมเมอร์) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในทางการค้า.....	66
4.9 ภาพ Gel electrophoresis ของ (a) <i>Listeria</i> spp. จาก 4 ไพรมเมอร์เปรียบเทียบกันสองครั้งและ (b) <i>L. innocua</i> จากไพรมเมอร์ OMP-01 โดยผู้ทดสอบ 2 คน.....	68
4.10 ความชุกของ <i>Listeria</i> spp. แบ่งตามเวลาของการผลิต.....	71
4.11 แผนผังแสดงการพบ <i>L. innocua</i> LI 1.1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	80
4.12 แผนผังแสดงการพบ <i>L. welshimeri</i> LW 1.7 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	86
4.13 ภาพ Gel electrophoresis ของ <i>L. seeligeri</i> 22 ตัวอย่าง ที่พบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง.....	87
4.14 แผนผังแสดงการพบ <i>L. seeligeri</i> LS 1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต.....	88
4.15 แผนผังแสดงแหล่งการปนเปื้อนของ <i>L. innocua</i> LI 1.1 จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมผู้ผลิตภัณฑ์.....	92

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื้อไก่เป็นสินค้าเกษตรที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในระดับต้นๆ เพราะเป็นสินค้าที่มีศักยภาพในการส่งออกและสร้างรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท ในปี 2547 ประเทศไทยประสบปัญหาวิกฤติการณ์การระบาดของไข้หวัดนกซึ่งส่งผลให้การส่งออกเนื้อไก่สดไปยังต่างประเทศถูกระงับ ทำให้รายได้ของประเทศจากการส่งออกเนื้อไก่สดแช่เย็นและแช่แข็งลดลงจาก 24,774.51 ล้านบาท (ปี 2546) เหลือเพียง 1,744.19 และ 243.17 ล้านบาทในปี 2547 และปี 2548 ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการแปรรูปไก่สดไปเป็นผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกมากขึ้น โดยปริมาณการส่งออกเนื้อไก่ปรุงสุกในปี 2550 และ 2551 มีปริมาณ 322,471 และ 386,093 ตัน มูลค่า 36,791 และ 51,350 ล้านบาท ตามลำดับ (สมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย, 2552) ซึ่งประเทศไทยยังคงเป็นประเทศผู้ส่งออกเนื้อไก่เป็นอันดับ 4 ของโลก และมีประเทศญี่ปุ่นและสหภาพยุโรปเป็นผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกรายใหญ่ของไทย (สำนักมาตรการนำเข้าส่งออกสินค้าทั่วไป, 2549)

ปัจจุบันความปลอดภัยของอาหารกลายเป็นกระแสที่ทั่วโลกให้ความสำคัญมาก และกลายเป็นมาตรการทางการค้าที่ประเทศผู้นำเข้านามาใช้กันอย่างแข็งขันเพื่อเป็นข้อจำกัดทางการค้ามากขึ้น การผลิตอาหารที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลทั้งด้านคุณภาพและความปลอดภัยจึงเป็นเรื่องจำเป็นสำหรับผู้ประกอบการธุรกิจอาหารในยุคปัจจุบันเมื่อประเทศไทยต้องการเป็น “ครัวของโลก” ผลิตภัณฑ์อาหารที่จะส่งออกจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้านั้นๆ เช่น ข้อกำหนดเกี่ยวกับสุขอนามัยของอาหาร (Directive 93/43/EEC: Hygiene of Foodstuffs) ของหน่วยงานความปลอดภัยอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority: EFSA), กฎหมายสุขอนามัยอาหารของญี่ปุ่น (Food Sanitation Law) เป็นต้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ที่จะส่งออกนั้นจะต้องเป็นไปตามมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออกของกรมปศุสัตว์ด้วย โดยกรมปศุสัตว์กำหนดให้โรงงานอุตสาหกรรมที่จะส่งออกต้องมีการจัดทำหลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practices: GMP) และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point: HACCP) ซึ่งเป็นระบบประกันคุณภาพของอาหาร เพื่อลดความเสี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Food borne disease bacteria)

แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ผู้ผลิตจะดำเนินการตามหลักเกณฑ์วิธีการผลิตที่ดีในการผลิต และระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุมแล้วก็ตาม แต่ก็พบว่ายังคงมีปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่เนืองๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* ซึ่งมักปนเปื้อนภายหลังจากการปรุงสุก *L. monocytogenes* นี้เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทั่วโลกให้ความสำคัญเป็นอย่างมากในปัจจุบัน และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอาหารพร้อมบริโภคทั้งประเภทแช่เย็นและแช่แข็ง เนื่องจากจุลินทรีย์นี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิต่ำ และ *L. monocytogenes* นี้ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอัตราการทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตสูงถึงประมาณร้อยละ 30 (Yucel et al., 2004) ในปี 2552 (ตั้งแต่เดือนมค.ถึงธค.) โรงงานผลิตไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภคแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออกแห่งหนึ่งต้องสูญเสียรายได้จากสินค้าที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. ถึง 12,158,000 บาท (ข้อมูลจากการสัมภาษณ์ผู้ผลิตรายหนึ่ง) ซึ่งถึงแม้ว่ากฎหมายกำหนดให้ในผลิตภัณฑ์ต้องไม่พบ *L. monocytogenes* เท่านั้น ไม่ได้ครอบคลุมถึง *Listeria* species อื่นๆ แต่ในระดับผู้ค้าด้วยกันเองในระดับสากล การพบเพียง *Listeria* spp. นั้นก็ไม่ได้มีการยอมรับ (ข้อมูลจากการสัมภาษณ์ผู้ผลิตรายหนึ่ง) ดังนั้นผู้ผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร และนักวิจัยทั่วโลกจึงให้ความสำคัญกับปัญหานี้มากขึ้น และได้มีการศึกษาถึงแนวทางที่จะควบคุม *L. monocytogenes* อย่างกว้างขวาง แต่การปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* นี้มีแหล่งที่มาหลากหลาย ทำให้การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อผู้ผลิตที่ทำได้ยาก ปัจจุบันการวิเคราะห์ในโรงงานอุตสาหกรรมและหน่วยงานของรัฐจะเป็นการวิเคราะห์ในระดับชนิด (species) ของ *Listeria* เท่านั้น ไม่สามารถจำแนกในระดับสายพันธุ์ เมื่อพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตก็ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของการปนเปื้อนได้ ทำให้ไม่สามารถควบคุมแหล่งที่มาของการปนเปื้อนในโรงงานอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ผลงานวิจัยที่ผ่านมา ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. โดยใช้หลักการทางสถิติซึ่งพบว่าการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่งผลต่อการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ (Lekroengsin, Keeratipibul & Trakoonlerswilai, 2007) อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาจไม่ใช่เชื้อเดียวกันกับที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม การแก้ปัญหาจึงอาจจะไม่ตรงประเด็นกับปัญหาการปนเปื้อนที่แท้จริง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- ประเมินความเสี่ยงโดยศึกษาแหล่งที่มาและเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในกระบวนการผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา
- หาแนวทางการควบคุมและจัดการความเสี่ยง เพื่อลดการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายอย่างมีประสิทธิภาพ และส่งเสริมให้มีระบบประกันคุณภาพและความปลอดภัยที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การระบุแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตของโรงงานไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภคแช่แข็งที่มีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยดูความสัมพันธ์ในระดับสายพันธุ์ (strain) โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบถึงแหล่งต้นตอที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ *Listeria* ในผลิตภัณฑ์
- สามารถติดตามการแพร่กระจายของ *Listeria* ภายในบริเวณการผลิตได้
- ควบคุมการปนเปื้อนของ *Listeria* และภายในบริเวณการผลิตและการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์อย่างมีประสิทธิภาพ
- ใช้เป็นแนวทางการติดตามการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆในโรงงานได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Listeria* spp.

Listeria เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก รูปร่างแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ (ภาพที่ 2.1) เติบโตได้ทั้งที่อุณหภูมิต่ำและในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนในปริมาณที่ต่ำมาก (facultative anaerobes) เคลื่อนที่ได้เมื่ออยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิ 20 ถึง 25 °C แต่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิ 37 °C (Dons et al., 1992; Farber, 1991; Van Renterghem, 1991; Macgowan, 1994)



ภาพที่ 2.1 *Listeria monocytogenes* (Dennis Kunkel Microscopy, Inc.)

Listeria spp. จัดเป็นจุลินทรีย์ประเภท mesophile ที่สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้ในที่อุณหภูมิต่ำ โดยมีภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตมากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 37 °C และ pH เท่ากับ 7.0 โดยเมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสมจะมีระยะเวลาการแบ่งตัว (generation time) ประมาณ 45 นาที ตารางที่ 2.1 แสดงปัจจัยและขอบเขตของการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp.

ตารางที่ 2.1 ปัจจัยที่จำกัดการเติบโตของ *Listeria* spp. (ICMSF, 1996)

ปัจจัย	ต่ำสุด	สูงสุด
อุณหภูมิ	-0.4°C (31.3°F)	45°C (113°F)
pH	4.39	9.4
a _w	0.92 (11.5 % เกลือ)	-

Listeria spp. ประกอบด้วย 6 species คือ *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* และ *L. grayi* โดยการแบ่งแยก *Listeria* spp. แต่ละชนิดจะแยกโดยใช้ hemolytic phenotype และการหมักน้ำตาลที่จำเพาะ (Rocourt, 1988; Farber & Peterkin, 1991) สำหรับความแตกต่างระหว่าง *L. monocytogenes* และ *Listeria* ชนิดอื่นๆที่แบ่ง

โดยใช้ความสามารถในการหมักและสร้างกรดจากน้ำตาล mannitol, rhamnose และ xylose รวมทั้งการทดสอบ CAMP test (Christie Atkins Munch-Peterson phenomenon) และดูปฏิกิริยา β -haemolysis แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะที่จำแนกชนิดของ *Listeria* (Warburton et al., 2003)

คุณลักษณะทางชีวเคมี	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>
β - Haemolysis	+ ^a	-	+	-	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnose	+	+/-	-	+/-	-	-
D-Xylose	-	-	+	+	+	-
CAMP test (<i>S. aureus</i>)	+ ^b	-	+	-	-	-
CAMP test (<i>R. Equi</i>)	-	-	-	-	+	-
การสร้างกรดจาก:						
Dextrin	+/-	-			-	+
Galactose	+/-	-			+/-	+
Lactose	+/-	+			+	+
D-Xylose	-	-			-	+
Melezitose	+/-	+/-			+/-	-
Sorbitol	+/-	-			-	-
Soluble starch	-	-			-	+
Sucrose	-	+/-			+/-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+
ปฏิกิริยา Hydrolysis:						
Hippurate	+	+			+	-
Strach	+/-	+/-			-	-
Lecithinase	+/-	+/-			+	-
Phosphatase	+	+			+	+

+/- คือ ปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวก, ลบ และเป็นได้ทั้งบวกและลบ

^a ยกเว้น *L. monocytogenes* สายพันธุ์ ATCC 15313 ซึ่งไม่พบปฏิกิริยา β -haemolysis ในเลือดม้า แกะ และวัว

^b ยกเว้น *L. monocytogenes* สายพันธุ์ ATCC 15313 ซึ่งให้ผลเป็นลบ

Listeria spp. ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค คือ *L. monocytogenes* โดยทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในคนและสัตว์ (Gellin and Broome, 1989; Lorber, 1997) แต่อย่างไรก็ตามทุกสายพันธุ์ (strain) ของ *L. monocytogenes* ไม่ได้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค มีเพียง 3 serovars จากทั้งหมด 11 serovar ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ที่เป็นสาเหตุของโรค listeriosis ในคน ส่วนใหญ่เป็น serovar 4b และที่พบเป็นครั้งคราวเป็น serovars 1/2a และ 1/2b (Faber and Peterkin, 2000) ซึ่งก่อให้เกิดโรค listeriosis ได้มากถึงร้อยละ 89 ถึง 96

ตารางที่ 2.3 Serotype และการเกิดโรคในหนูของ *Listeria* ชนิด (species) ต่างๆ (Warburton et al., 2003)

ชนิด	Serotype	การเกิดโรคในหนู
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4b(x), 4c, 4d, 4e, 7	+
<i>L. ivanovii</i>	5	+
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, un*	-
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b	-
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, un*	-

*un คือ ยังไม่กำหนด

2.2 โรค Listeriosis

โรค listeriosis เริ่มเป็นที่รู้จักในช่วงทศวรรษที่ 1980 เนื่องจากเกิดการระบาดของโรค listeriosis อย่างรุนแรงในอเมริกาเหนือและยุโรป เมื่อมีการค้นหาสาเหตุ พบว่าสาเหตุของการระบาดมาจากอาหาร (Bille, 1990; Broome et al., 1990) โรค listeriosis เป็นโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *L. monocytogenes* โรคนี้มีโอกาสพบค่อนข้างยาก แต่เมื่อเป็นแล้วจะมีความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงเมื่อเทียบกับโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นที่พบในอาหาร ดังผลแสดงในตารางที่ 2.4 ที่แสดงให้เห็นว่าจากเหตุการณ์ระบาดในสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี 1998-2002 รวม 11 เหตุการณ์ มีจำนวนผู้ป่วยเพียง 256 คน แต่มีจำนวนผู้เสียชีวิตมากที่สุด (38 คน) เมื่อเทียบกับการระบาดของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหารเป็นจำนวนมาก แต่ในการระบาดขนาดใหญ่หรือการป่วยเป็นรายๆ ไปนั้น ส่วนใหญ่จะเกิดจากอาหารประเภทพร้อมบริโภคและมักเป็นอาหารที่ผลิตในระดับ

อุตสาหกรรม ซึ่งส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจสูงที่สุดในบรรดาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นที่พบในอาหาร (Rocourt, 1988; Roberts and Pinner, 1990)

ตารางที่ 2.4 จำนวนครั้งของเหตุการณ์ระบาดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจากอาหาร จำนวนผู้ป่วย และจำนวนผู้เสียชีวิตที่ได้รับรายงานในสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1998-2002 (Lynch et al., 2006)

จุลินทรีย์	เหตุการณ์ระบาด (จำนวนครั้ง)	จำนวนผู้ป่วย (คน)	จำนวนผู้เสียชีวิต (คน)
<i>Bacillus cereus</i>	37	571	0
<i>Brucella</i>	1	4	0
<i>Campylobacter</i>	61	1,440	0
<i>Clostridium botulinum</i>	12	52	1
<i>Clostridium perfringens</i>	130	6,724	4
<i>Escherichia coli</i>	140	4,854	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	11	256	38
<i>Salmonella</i>	585	16,921	20
<i>Shigella</i>	67	3,677	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	101	2,766	2
<i>Streptococcus</i>	1	4	0
<i>Vibrio cholerae</i>	3	12	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25	613	0
<i>Vibrio</i> อื่นๆ	1	2	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8	87	0
แบคทีเรียอื่นๆ	1	4	0
รวม	1,184	37,887	70

โรค listeriosis แบ่งตามลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ประเภท คือ invasion และ non-invasion โดยทั่วไป listeriosis แบบ invasion จะเกิดการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อของลำไส้ และลุกลามไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น รกของเด็กในครรภ์ ระบบประสาทส่วนกลาง เลือด หรือหลายส่วนร่วมกัน ผู้ป่วยจะมีอัตราการเสียชีวิตสูง (Mead et al., 1999) การระบาดของโรค listeriosis แบบ

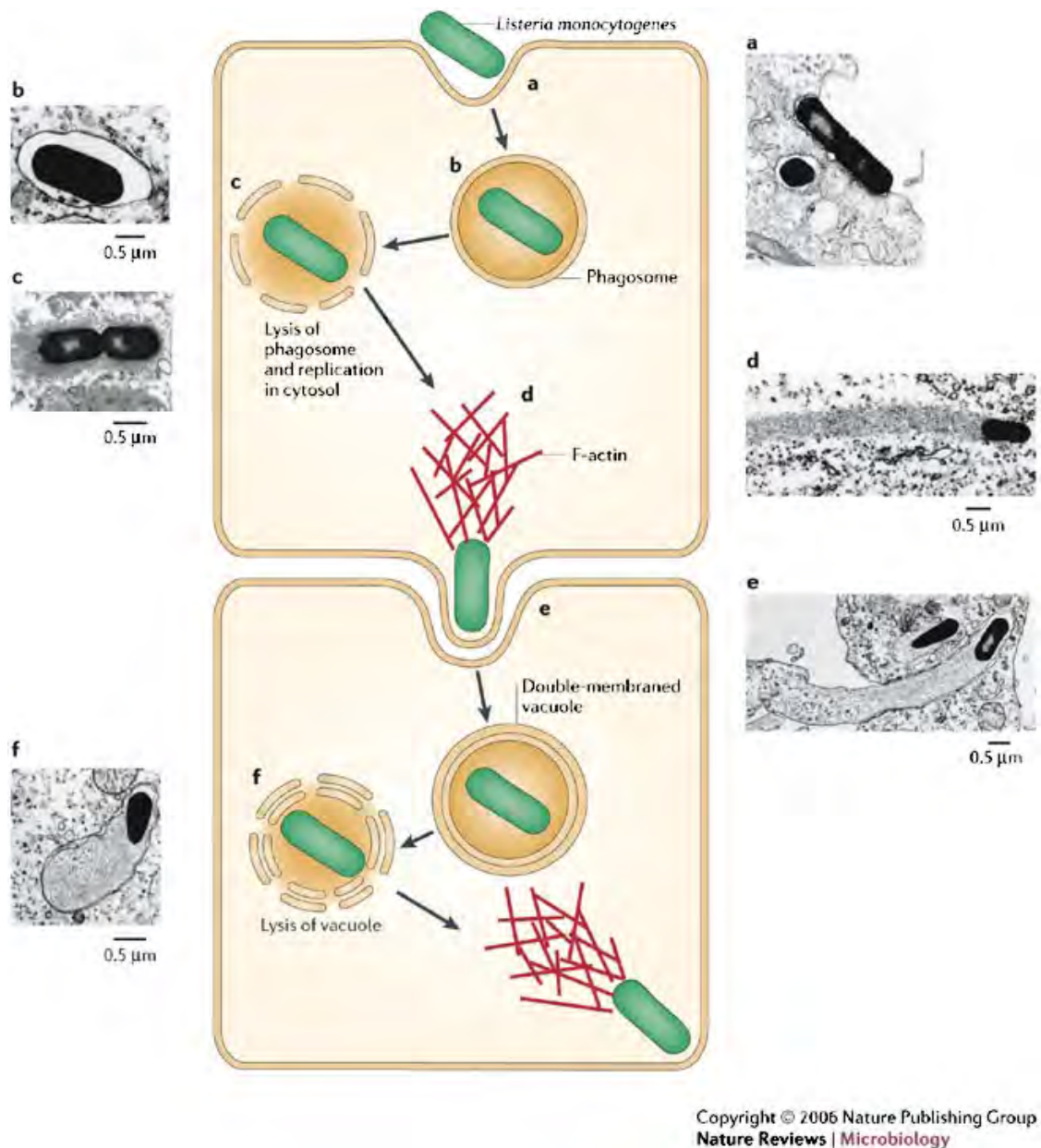
non-invasion ก็พบหลายครั้ง ผู้ป่วยจะมีอาการของ gastroenteritis เช่น ท้องร่วง ปวดหัว และปวดกล้ามเนื้อ (Reido et al., 1994; Salamina et al., 1996; Dalton et al., 1997; Aureli et al., 2000)

โรค listeriosis เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนมากับอาหารที่บริโภคเข้าสู่ร่างกาย *L. monocytogenes* จะก่อตัวอยู่ในลำไส้ และผ่านเยื่อบุลำไส้เข้าไป หลังจากนั้นเชื้อจะเริ่มแบ่งตัวในตับและม้าม แล้วเกิดการกระจาย (ขึ้นกับ T cell-mediated immunity ของผู้ที่ได้รับเชื้อ) หรือกระจายไปตามกระแสเลือดสู่อวัยวะต่างๆ ในระหว่างที่ *L. monocytogenes* เข้าสู่ลำไส้แล้ว ผู้ที่ได้รับเชื้อมักมีอาการลำไส้อักเสบ และการที่ *L. monocytogenes* แบ่งตัวในตับและม้าม ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการคล้ายเป็นไข้หวัด เช่น มีไข้และหนาวสั่น ซึ่งผู้ที่ติดเชื้อต้องได้รับการรักษาโดยทันที

กลไกการบุกรุกของ *L. monocytogenes* เมื่อเข้าสู่ร่างกายนั้นประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (Orndorff et al., 2006) คือ

1. *L. monocytogenes* จากลำไส้จะเข้าสู่เซลล์
2. *L. monocytogenes* จะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยผนังของ vacuole ทำให้ *L. monocytogenes* ออกมาอยู่ใน mitochondria
3. *L. monocytogenes* เพิ่มจำนวน
4. *L. monocytogenes* ออกจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง

ยีนส์ *prfA* ในเซลล์ของ *L. monocytogenes* จะผลิต intermalin A (*inIA*) และ intermalin B (*inIB*) ซึ่งเฉพาะเจาะจงกับตัวรับ *InIA* ที่ผนังเซลล์ของโฮสต์เกิดเป็น vacuole ล้อมรอบ *L. monocytogenes* หลังจากนั้นยีน *hly* และ *plcA* จะผลิตสาร Listeriosin O และ phospholipase C (PLC) 2 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย phosphatidyl inositol (PI-PLC) และ phosphatidylcholine ((PC)-PLC) ตามลำดับ ซึ่ง Listeriosin O จะทำให้ *L. monocytogenes* รอดพ้นจากการถูกจับและทำลายจาก phagocytic vacuole (Portnoy et al., 1988; Gedded et al., 2000) สำหรับเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะทำงานร่วมกับ Listeriosin O ในการย่อย vacuole แล้ว *L. monocytogenes* จะเพิ่มจำนวนและมีการปรับตัวมีผนังหุ้ม 2 ชั้น หลังจากนั้น *L. monocytogenes* จะเคลื่อนที่ไปที่ปลายของ actin polymerization tail เข้าไปยังเซลล์ข้างเคียง แล้ว *L. monocytogenes* จะออกจาก double membrane vacuole ตามด้วยเข้าสู่การเพิ่มจำนวน แล้วออกจากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์ข้างเคียงอีกครั้ง การบุกรุกของ *L. monocytogenes* เข้าสู่เซลล์แสดงดังในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ภาพจำลองการบุกรุกเข้าสู่เซลล์และภาพ electron micrographs ของ *L.*

เนื่องจากการกระจายของ *L. monocytogenes* ในร่างกายขึ้นกับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับเชื้อ listeriosis อาการจะแตกต่างกันไปและจะมีอาการกับระบบอื่นของร่างกายมากกว่าระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นโรคนี้จึงส่งผลกระทบต่อประชากรในกลุ่มจำเพาะบางกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อโรคมากกว่าประชากรทั่วไป ซึ่งประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการเป็นโรค listeriosis (Gillbert et al., 2009) ได้แก่:

- หญิงมีครรภ์ มีความเสี่ยงต่อโรค listeriosis มากกว่าคนสุขภาพดีทั่วไปถึง 20 ซึ่งในประเทศเดนมาร์ก และสหรัฐอเมริกา มีรายงานว่ามีผู้ป่วยเป็นโรค listeriosis ประมาณ 1 ใน 3 เป็นหญิงตั้งครรภ์ ขณะที่ในประเทศสวีเดน และเยอรมัน จะมีผู้ป่วยโรค listeriosis ถึง 2 ใน 3 ที่เป็นหญิงตั้งครรภ์

- ทารกแรกเกิด ซึ่งติดเชื้อระหว่างอยู่ในครรภ์มารดา
- ผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันไม่แข็งแรง
- ผู้ป่วยโรคไต เบาหวาน หรือมะเร็ง
- ผู้ป่วยโรคเอดส์ มีความเสี่ยงต่อโรคมมากกว่าผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติถึง 300 เท่า
- ผู้ได้รับการรักษาทางการแพทย์ด้วยฮอร์โมน glucocorticosteroid
- ผู้สูงอายุ

อาการของโรค listeriosis แบ่งได้ 5 ประเภท (NSW Department of Health, 2002) คือ

1. Pregnancy infections: เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดระหว่างการตั้งครรภ์ ผู้ป่วยจะมีอาการเป็นไข้จับสั่น ปวดหัว ปัสสาวะไม่มีสี ผู้ป่วยบางรายจะมีอาการคอหอยอักเสบ ท้องเสีย ซึ่งถ้าหากนำเนื้อเยื่อในช่องคลอด รก และปัสสาวะมาตรวจจะพบ *L. monocytogenes* อยู่ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ นอกจากนี้แล้วโรคชนิดนี้อาจทำให้เกิดการติดเชื้อในทารกได้ด้วย

2. Granulomatosis infantiseptica: เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในทารกซึ่งจะมีอาการหายใจติดขัด หัวใจเต้นเบา ผิวหนังเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากขาดอากาศหายใจ อาเจียน ชักและอุจจาระเป็นเมือก จะเกิดปุ่มเล็กๆขึ้นในตับ ม้าม adrenal gland ปอด หลอดอาหาร และต่อม tonsils

3. Sepsis: ผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่จะมีอาการหนาวสั่น มีไข้ คอหอยอักเสบ เม็ดเลือดขาวแตก ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการเพราะมีภูมิคุ้มกัน แต่ในทารกแรกเกิดจะแสดงอาการของโรคหลังจากเกิดได้ 3 วัน ซึ่งส่วนใหญ่ติดเชื้อระหว่างหรือหลังจากคลอดมากกว่าการติดเชื้อในมดลูก และพบว่ามารดาของเด็กทารกส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ และอาการที่พบในเด็กจะเหมือนกับอาการที่พบในผู้ใหญ่

4. Meningoencephalitis: อาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือไขสันหลังอักเสบซึ่งพบในทารกแรกเกิด และผู้ใหญ่ โดยทั่วไปจะพบในคนที่อายุสูงกว่า 50 ปี ผู้ป่วยโรคนี้จะมีอาการหายใจหอบ ผิวหนังเป็นสีน้ำเงินอ่อนๆ เนื่องจากขาดอากาศหายใจ เฉื่อยชา เป็นไข้ การเจริญเติบโตหยุดชะงัก เบื่ออาหาร ชัก และส่วนใหญ่เสียชีวิต 2 ใน 8 ของเด็กที่รอดชีวิตเมื่ออายุได้ 16 เดือน จะปัญญาอ่อน พิการ อาการในผู้ใหญ่จะคล้ายไข้หวัดใหญ่ แล้วตามด้วยปวดหัว หนาวสั่น เป็นไข้ คลื่นไส้ อาเจียน กลัวแสง และตับแข็ง ผู้ป่วยจะว่างซึม เพ้อคลั่ง และเสียชีวิตในที่สุด

5. Focal infections: โรคชนิดนี้จะมีระยะของโรค 2 ระยะ โดยในช่วงแรกจะมีอาการปวดหัว ปวดหลัง อาเจียน เยื่อตาขาวอักเสบ และเยื่อเมือกในช่องจมูกอักเสบ ในระยะที่ 2 ผู้ป่วยจะมีไข้สูง และระบบประสาทส่วนกลางจะไม่สามารถทำงานได้ปกติ และจะเสียชีวิตในที่สุด

Farber และ Peterkin (2000) สรุปสถิติของผู้ที่เป็นโรค listeriosis จำนวน 222 คน ซึ่งอยู่ในภาวะของการป่วยด้วยโรคต่างๆ ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ขณะที่อยู่ในภาวะของการป่วยต่างๆ (Farber and Peterkin, 2000)

ภาวะของการป่วย	จำนวนผู้ป่วยที่พบ
มะเร็ง	135 (61%)
ปลุกถ่ายอวัยวะ	33 (15%)
เบาหวาน	24 (11%)
ตับอักเสบเรื้อรัง	11 (5%)
เอดส์	11 (5%)
โรคกล้ามเนื้อและ collagen	8 (3%)

จากตารางที่ 2.5 พบว่าในจำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis จำนวน 222 คนนั้น อยู่ในภาวะที่เป็นโรคมะเร็งสูงที่สุด สูงกว่าผู้ที่ปลุกถ่ายอวัยวะ ผู้ที่เป็นเบาหวาน ผู้ที่เป็นตับอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วยโรคเอดส์ และผู้ที่เป็นโรคกล้ามเนื้อและ collagen จะเห็นว่าผู้ที่มีสภาพร่างกายอ่อนแอมีโอกาสเป็น listeriosis มาก Tompkin (2002) ได้รายงานการระบาดของโรค listeriosis และอาหารที่เป็นแหล่งการปนเปื้อน แสดงดังในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างเหตุการณ์ระบาดของ *L. monocytogenes* ที่สำคัญในปี 1985-2008

ปี	ประเทศ	สาเหตุ	จำนวน ผู้ป่วย (คน)	จำนวน ผู้เสียชีวิต (คน)	เอกสารอ้างอิง
1985	อเมริกา	เนยเหลว	142	*	Linnan et al. (1988)
1985-1987	เดนมาร์ก	ไม่ทราบ	35	*	Frederiksen et al. (1991)
1987-1988	อังกฤษ	ตับบด	> 300	*	McLauchlin et al. (1990)
1992	ฝรั่งเศส	ลิ้นหมู	279	*	Salvat et al. (1995)
1993	ฝรั่งเศส	Pork rilletes	39	*	Rocourt et al. (1993)
1994	อเมริกา	นม	53	*	Dalton et al. (1997)
1995	ฝรั่งเศส	เนยเหลว	36	*	Goulet (1995); Rocourt and Bille (1997)
1998	อเมริกา	ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก	108	18	CDC (1999)
1998	ฟินแลนด์	เนยเหลว	25	24	Lyytikäinen et al. (2000)
2000	ฝรั่งเศส	เนื้อหมู	32	31	Kathariou (2002)
2000	อเมริกา	ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก	30	7	CDC (2000)
2002	อเมริกา	ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก	54	11	CDC (2003)
2003	อเมริกา	เนยแข็ง	12	2	CDC (2003)
2005	สวิสเซอร์แลนด์	เนยแข็ง	11	2	Swissinfo (2005)
2007	นอร์เวย์	เนยแข็ง	12	2	Johnsen et al. (2010)
2008	แคนาดา	เนื้อแดง (red meat)	53	20	CFIA (2008)

* ไม่มีข้อมูล

จากตารางที่ 2.6 แสดงให้เห็นว่าเหตุการณ์ระบาดของโรค listeriosis เนื่องจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *L. monocytogenes* เกิดขึ้นในหลายประเทศและระบาดเป็นประจำเกือบทุกปี ซึ่งการระบาดครั้งใหญ่เกิดขึ้นที่ประเทศอังกฤษในช่วงปี 1987-1988 พบว่าสาเหตุมาจากการปนเปื้อนในตับบด

2.3 การปนเปื้อนของ *Listeria* spp.

2.3.1 การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อม

Listeria spp. เป็นจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปมักพบ *Listeria* spp. ในดิน น้ำ สิ่งสกปรก พืชผักที่เน่าเปื่อย น้ำเสียจากโรงฆ่าสัตว์ น้ำนมของทั้งแม่วัวปกติและที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ อุจจาระของคนและสัตว์ (Farber, 1991; Van Renterghem et al., 1991; MacGowan et al., 1994) โดยทั่วไปมักพบ *Listeria* อยู่ร่วมกับ Lactic acid bacteria, *Brochothrix* และ coryneform bacteria บางชนิด ดังนั้นจึงพบ *Listeria* ชนิดเดียวกันในหญ้าหมักกับผลิตภัณฑ์นมเป็นประจำ (Fenlon, 1985) Ryser และคณะ (1997) ได้ศึกษาปริมาณการพบ *Listeria* ชนิดต่างๆในอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพด ฟาง และหญ้าหมัก โดยสำรวจตัวอย่างทั้งหมด 210 ตัวอย่าง พบว่ามี *L. innocua* ปนเปื้อนอยู่มากที่สุดถึง 84% รองลงมาคือ *L. monocytogenes* และ *L. welshimeri* ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 การพบ *Listeria* ชนิดต่างๆในตัวอย่างข้าวโพด ฟาง และหญ้าหมักสำหรับเลี้ยงสัตว์ จำนวน 210 ตัวอย่าง (Ryser et al., 1997)

ชนิด	ปริมาณการพบ
<i>L. innocua</i>	83.70%
<i>L. monocytogenes</i>	13.50%
<i>L. welshimeri</i>	2.70%

ในปี 1995 Pritchard และคณะ ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การผลิตของโรงงานผลิตนม โดยเก็บตัวอย่างโดยการใช้ฟองน้ำ swab รวมทั้งหมด 378 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *L. innocua* อยู่มากที่สุด รองลงมาเป็น *L. monocytogenes* และ *L. seeligeri* ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 การพบ *Listeria* ชนิดต่างๆในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมและอุปกรณ์การผลิต 378 ตัวอย่างในโรงงานผลิตนม (Pritchard et al., 1995)

ชนิด	ปริมาณการพบ
<i>L. innocua</i>	60%
<i>L. monocytogenes</i>	35%
<i>L. seeligeri</i>	5%

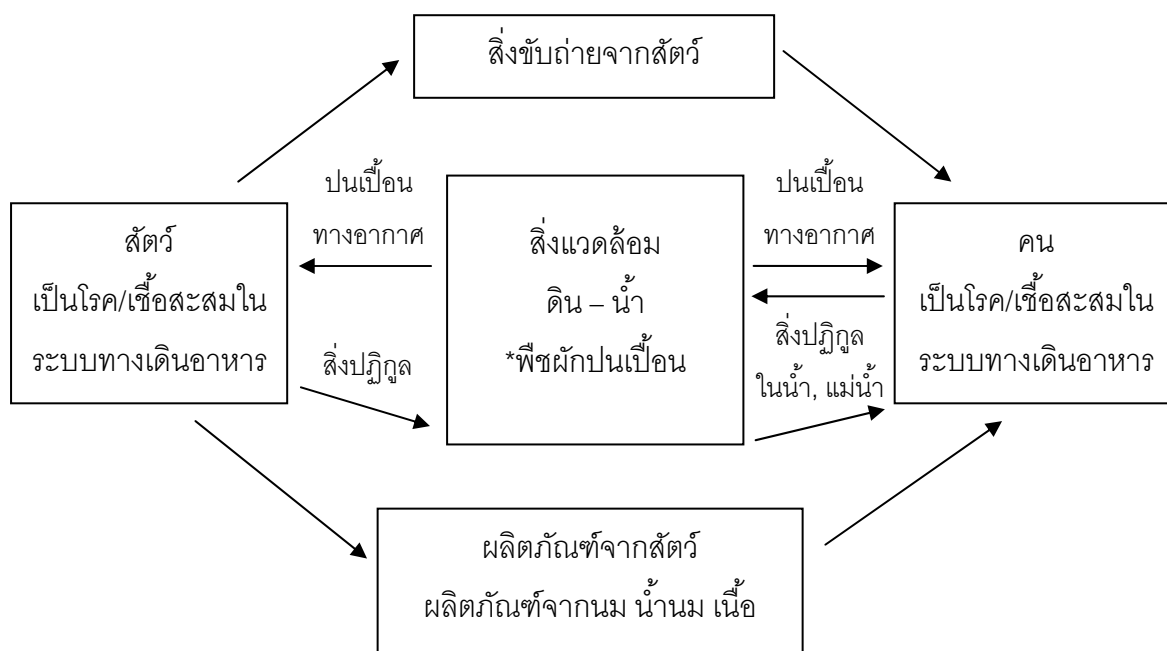
ในขณะที่ Odumeru และคณะ (2004) พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่มากที่สุดเกือบ 90% ของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมภายในบริเวณการผลิต รองลงมาคือ *L. innocua*, *L. seeligeri* และ *L. ivanovii* ดังผลแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 การพบ *Listeria* ชนิดต่างๆในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมภายในบริเวณการผลิตจำนวน 552 ตัวอย่าง (Odumeru et al., 2004)

ชนิด	ปริมาณการพบ
<i>L. monocytogenes</i>	89.40%
<i>L. innocua</i>	8.80%
<i>L. seeligeri</i>	0.90%
<i>L. ivanovii</i>	0.90%

Listeria สามารถมีชีวิตอยู่ในดินชื้นได้นานถึง 295 วัน (Welshimer, 1960) ในการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในบริเวณน้ำกร่อยในเขตแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา พบว่าตรวจพบ *L. monocytogenes* ใน 62% จาก 37 ตัวอย่างของน้ำจืดหรือน้ำที่มีความเค็มต่ำ และพบใน 17.4% ของตัวอย่างตะกอน 46 ตัวอย่าง (Colburn et al., 1990)

ตัวอย่างเส้นทางการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างแหล่งการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมสู่คน แสดงดังในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 เส้นทางการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างสิ่งแวดล้อม สัตว์ อาหาร และคน (Audurier and Martin, 1989)

2.3.2 การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร

พื้นผิวที่เปียกชื้นในโรงงานผลิตอาหารเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการกักเก็บและเติบโตของ *Listeria* spp. ซึ่งสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารพร้อมบริโภคจึงมักพบปัญหาการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในส่วนแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งหลังกระบวนการให้ความร้อนของโรงงาน (ICMSF, 1996)

ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ อาจพบ *Listeria* ได้ทั้งในเนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อแกะ ผลิตภัณฑ์ได้กรอก และผลิตภัณฑ์เนื้อพร้อมบริโภค รวมถึงเนื้อสัตว์ปีกด้วย (Johnson et al., 1990) โดย Gibbons และคณะฯ (2005) สรุปว่าในผลิตภัณฑ์เนื้อปรุงสุกพร้อมบริโภคมีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ร้อยละ 1.8 ถึง 48 ในขณะที่ Jay (1996) รายงานว่าในเนื้อที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้ว พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ประมาณ ร้อยละ 16 รวมทั้งยังได้สรุปการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในเนื้อดิบ โดยรวบรวมจากรายงานต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 การพบ *L. monocytogenes* ในเนื้อหมูและวัวดิบ (Jay, 1996)

ปี	ผลิตภัณฑ์	จำนวน positive/ จำนวนที่ตรวจสอบ	ประเทศ	อ้างอิงจาก
1987	เนื้อหมู	4/31 (13%)	สวีตเซอร์แลนด์	Breer and Schopfer (1998)
1988	เนื้อหมู	23/58 (40%)	เยอรมัน	Karches and Teufel (1998)
1988	คอและหนังวัว	8/17 (47%)	เดนมาร์ก	Skovgaard and Morgan (1998)
1989	ซากวัว	21/90 (23%)	สหรัฐฯ	Bailey et al. (1989)
1990	เนื้อหมู	7/25 (28%)	จีน	Varabioff (1992)
1990	เนื้อวัวแช่เยือกแข็ง	15/90 (16%)	ออสเตรเลีย	Varabioff (1992)
1993	ชิ้นส่วนวัว	42/67 (63%)	มาเลเซีย	Arumugaswamy et al. (1994)

นอกจากนี้ Jay (1996) ได้สรุปการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูและวัว โดยรวบรวมจากรายงานต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 การพบ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูและวัว (Jay, 1996)

ปี	ผลิตภัณฑ์	จำนวน positive/ จำนวนที่ตรวจสอบ	ประเทศ	อ้างอิงจาก
1976	เนื้อวัวอบ	10/68 (15%)	อังกฤษ	Gitter (1976)
1990	เนื้อหมูอบ	3/50 (6%)	สหรัฐฯ	Johnson et al. (1990)
1992	แฮม	12/80 (15%)	ออสเตรเลีย	Wang et al. (1992)

จากตารางที่ 2.11 จะเห็นว่ามี การปนเปื้อน *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่ปรุงสุกแล้ว คือ ในเนื้อวัวอบ, หมูอบ และแฮมร้อยละ 15, 6 และ 16 ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวอบจะเท่ากับที่พบในเนื้อวัวสดแช่แข็งซึ่งเป็นเนื้อดิบ ที่ระดับร้อยละ 15

นอกจากการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูและวัวแล้ว หน่วยงานความปลอดภัยของอาหารของนิวซีแลนด์ ได้สำรวจการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกปรุงสุกจากประเทศต่างๆ ผลแสดงดังในตารางที่ 2.12 พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หลายประเภท ได้แก่ เนื้อไก่ปรุงสุก เนื้อไก่วงพร้อมบริโภค ตับไก่สด เนื้อไก่ชุบแป้งขนมปังทอด และแซนวิชไก่ เป็นต้น

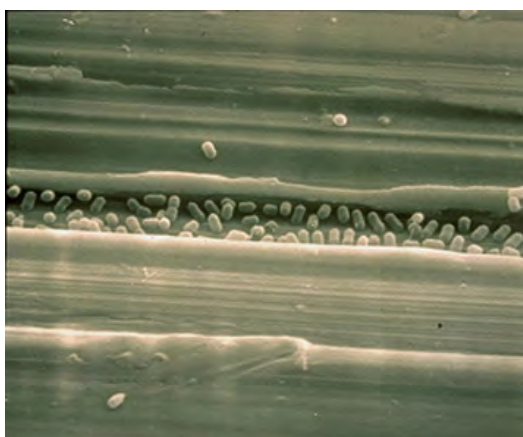
ตารางที่ 2.12 การพบ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Gilbert et al., 2009)

ประเทศ	ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก	จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์	ปริมาณการพบ <i>L. monocytogenes</i>	ปี	อ้างอิงจาก
ออสเตรเลีย	เนื้อไก่ปรุงสุก	50	16	1991	Trott et al., 1991
ออสเตรเลีย	ตับไก่สด	30	16.6	1991	Trott et al., 1991
เบลเยียม	เนื้อไก่ปรุงสุก	53	16.9	1985-1990	Art & Andre, 1991
แคนาดา	เนื้ออกไก่วง	100	3	2001	Bohaychuk et al., 2006
แคนาดา	Chicken wiener	101	3	2001	Bohaychuk et al., 2006
เดนมาร์ก	เนื้อไก่วงพร้อมบริโภค	55	7.3	2000	Ojeniyi et al., 2000
อังกฤษ	เนื้อไก่แช่เย็นพร้อมบริโภค	758	6	1997	MAFF, 1997
อังกฤษ	ตับไก่สด	268	2	2002	Elson et al., 2004
อังกฤษ	แซนวิชไก่	376	5.9	2005-2006	Little et al., 2008
อเมริกา	เนื้อไก่พร้อมบริโภค	527	12	1996	Hitchins, 1996

NS = ไม่ได้กล่าวถึง

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์สุกก็มีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนโดย *Listeria* spp. ได้ในระดับสูงใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ดิบ ถึงแม้ว่าจะผ่านขั้นตอนการให้ความร้อนมาแล้วก็ตาม ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาหาที่มาของการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุกดังกล่าว โดยในปี 1999 Tompkin และคณะ ได้ศึกษาการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหารและสรุปว่าการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เกิดจากสิ่งแวดล้อมการผลิต โดยเกิดจากการที่ผลิตภัณฑ์สัมผัสพื้นผิวที่มีการปนเปื้อน นอกจากนี้มีนักวิจัยจำนวนมากศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ซึ่งพบว่า *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ มาจากสิ่งแวดล้อมการผลิตในห้องแช่เย็น และห้องตัดแต่ง (Pociecha, 1991; Van der Elen, 1993) มีอ (Kerr et al., 1993) และอุปกรณ์การผลิต (Lawrence and Gilmour, 1995)

ในปี 2002 Tompkin สรุปเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* จากสิ่งแวดล้อมการผลิตว่าสาเหตุหนึ่งของการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารปรุงสุก คือ การปนเปื้อนจากอุปกรณ์ในส่วนที่เป็นร่องหรือตัวหมุน (roller) ของสายพาน สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีการชุบเกล็ดขนมปัง พบว่าการปนเปื้อนเกิดจากอุปกรณ์ในส่วนของล้อรับสายพาน (wheel bearing) สายพานที่ออกจาก spiral freezer สำหรับใส่กรอกปรุงสุก พบว่าการปนเปื้อนเกิดจากรอยแตกของเครื่องบรรจุ การสะสมของ *L. monocytogenes* ในร่องบนพื้นผิวของอุปกรณ์การผลิต และเกิดการสร้างไบโอฟิล์ม (ภาพที่ 2.4) และสามารถก่อให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้โดยตรงหรือทางอ้อมเมื่อมีการสัมผัสที่พื้นผิวกับผลิตภัณฑ์หรือมือพนักงานผลิต



ภาพที่ 2.4 ภาพถ่าย SEM ของ *L. monocytogenes* เกิดเป็นไบโอฟิล์มในร่องบนผิวสแตนเลส (แหล่งที่มา: ASM MicrobeLibrary.org)

Hoffman และคณะ (2003) ได้ทดลองหาแหล่งของการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในโรงงานผลิตปลารมควัน ซึ่งได้ทำการวิจัยหาแหล่งของการปนเปื้อนในโรงงานปลารมควัน 2 โรงงาน เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดย swab พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมการผลิต คือพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร และพื้นผิวอื่นๆ ซึ่งประกอบด้วยพื้นผิวของที่จับประตู ก่องพลาสติก อุปกรณ์การผลิต และพื้นผิวของรางระบายน้ำ ผลการทดลองพบว่า ความชุกของ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวที่สัมผัสอาหาร พื้นผิวอื่นๆ และพื้นผิวของรางระบายน้ำ เท่ากับร้อยละ 3.1, 32.3 และ 62.5 ตามลำดับ และพบว่าภายในโรงงานผลิตปลารมควันมีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อมการผลิตทั้งโรงงาน

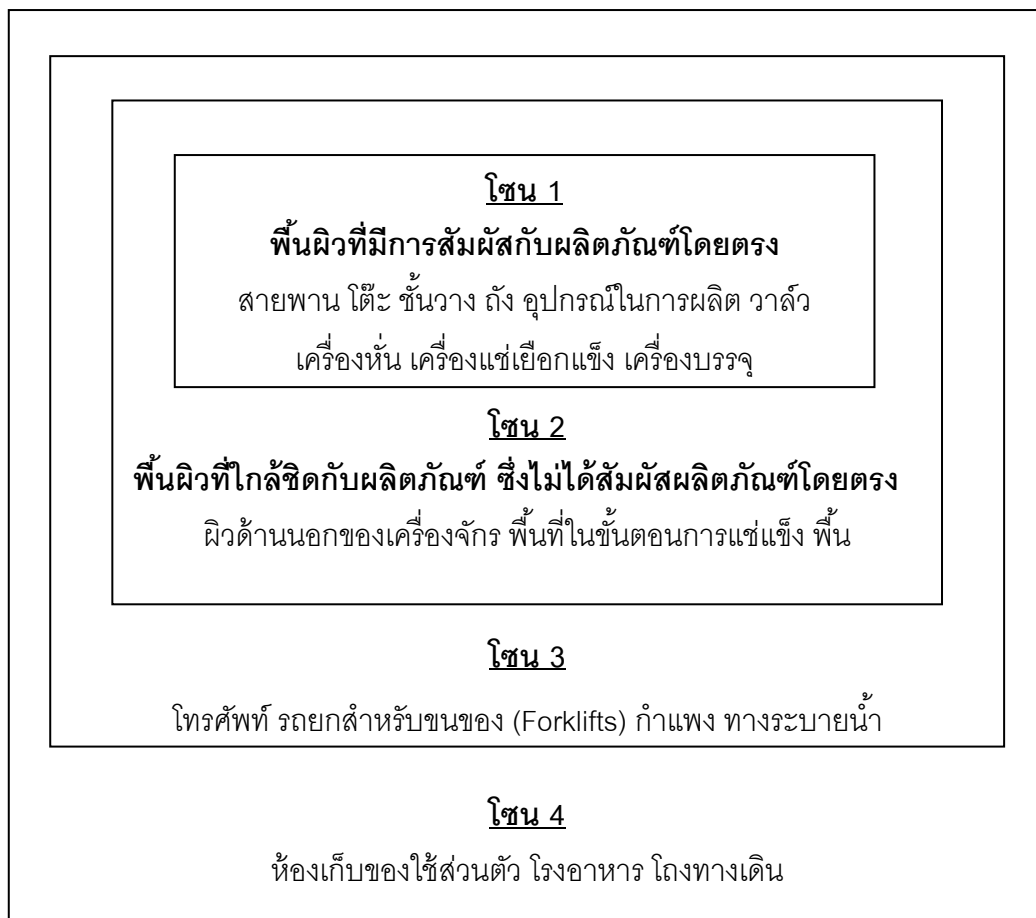
Victoria และคณะ (2004) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุกพร้อมบริโภคจากสิ่งแวดล้อมการผลิตในโรงงาน โดยทดลองในโรงงานกึ่งปรุงสุกพร้อมบริโภคจำนวน 2 โรงงานเป็นระยะเวลา 2 ปี และแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ซึ่งประกอบด้วยการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อมการผลิต ซึ่งแบ่งพื้นที่เป็นพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร ประกอบด้วย โต๊ะตระแกรง ถาด ถุงมือ และ/หรือ ผ้ากันเปื้อน พื้นผิวที่ไม่สัมผัสอาหารซึ่งประกอบด้วย ประตู และพัดลมดูดอากาศ และสุดท้ายคือพื้นผิวที่ของรางระบายน้ำ ผลการทดลองพบว่า มีการปนเปื้อน *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกึ่งปรุงสุกพร้อมบริโภคร้อยละ 0 ถึง 1 ส่วน พื้นผิวที่สัมผัสอาหารไม่พบ *L. monocytogenes* แต่พบ *L. monocytogenes* ในพื้นผิวที่ไม่สัมผัสอาหารซึ่งมีความชุกเท่ากับร้อยละ 4.2 ถึง 9.2 และพบ *L. monocytogenes* ในรางระบายน้ำเท่ากับร้อยละ 12 ถึง 40 ซึ่งการที่ผลิตภัณฑ์ และพื้นผิวที่ไม่สัมผัสอาหาร ไม่พบ *L. monocytogenes* หรือพบน้อยมาก แสดงว่าระบบสุขอนามัยมีประสิทธิภาพ และได้มีการป้องกันการเกิดการปนเปื้อนข้าม แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบ *L. monocytogenes* ที่รางระบายน้ำ

ในปี 2002 Tompkin แนะนำว่าในการควบคุม *L. monocytogenes* ให้ใช้การควบคุม *Listeria* spp. แทน และสรุปว่าในตัวอย่งที่พบ *Listeria* spp. จะพบ *L. monocytogenes* เป็นจำนวนร้อยละ 40 รวมทั้งแนะนำว่าในการควบคุม *L. monocytogenes* ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร ควรตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* spp. แทน *L. monocytogenes* เนื่องจาก การวิเคราะห์ *Listeria* spp. นั้นให้ผลที่เร็วกว่า ทำให้ดำเนินการแก้ไขปัญหาได้อย่างรวดเร็ว และเป็น การสร้างความตระหนักให้มีการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อน ทุกครั้งที่มีการพบ *Listeria* ไม่ว่า species ใดก็ตาม ให้ถือปฏิบัติว่ามีความสำคัญเทียบเท่ากับการพบ *L. monocytogenes*

นอกจากนี้การแบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมการผลิต ตามความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ผู้ผลิตภัณฑ์ จะทำให้สามารถควบคุมและกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้การแบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมการผลิตออกเป็นโซน หรือเรียกว่า zone concept ในการวางแผนการสัมผัสตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมการผลิต ซึ่งการสัมผัสตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระบบ Good Hygiene Practice (GHP) ว่าสามารถควบคุมความเสี่ยงในการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ในการแบ่งโซนของสิ่งแวดล้อมการผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว บริเวณที่ต้องควบคุมการปนเปื้อนอย่างเข้มงวดคือพื้นที่การผลิตหลังขั้นตอนการให้ความร้อนแล้ว และบริเวณที่ผลิตภัณฑ์เปิดสู่สภาพแวดล้อม โดยพื้นที่การผลิต ในระหว่างขั้นตอนการให้ความร้อนจนถึงขั้นตอนการบรรจุ เป็นบริเวณที่ต้องมีการควบคุมการปนเปื้อนอย่างเข้มงวดที่สุด

การแบ่งโซนมีหลักการคือให้แบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมการผลิตออกเป็นกลุ่ม ตามความเสี่ยงที่พื้นผิวนั้นจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ผู้ผลิตภัณฑ์ ดังตัวอย่างในภาพที่ 2.5 โดยโซนที่มีความเสี่ยงสูงสุด คือ โซน 1 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง โซนที่มีความเสี่ยงน้อยลงมา คือโซน 2 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรงแต่อยู่ใกล้ชิดกับผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนโดยอ้อมได้ สำหรับโซน 3 เป็นโซนที่มีความเสี่ยงน้อย โดยเป็นพื้นผิวที่อยู่ห่างออกมาจากผลิตภัณฑ์ แต่ต้องมีการดูแลและควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนข้ามไปยังโซน 1 และโซน 2 ได้ และสุดท้ายคือโซน 4 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่อยู่นอกพื้นที่การผลิต แต่ก็ต้องมีการดูแลรักษาความสะอาดเพื่อให้ไม่เป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการปนเปื้อนไปสู่โซน 1, 2 และ 3

การแบ่งโซนในแต่ละโรงงานจะขึ้นกับระดับความเสี่ยงของพื้นที่ที่จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจมีกี่โซนก็ได้ ในการแบ่งโซนต้องอาศัยความรู้และประสบการณ์ที่ได้จากการทำงานจริงในโรงงาน การแบ่งโซนที่เหมาะสมจะทำให้แผนการสัมผัสตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยไม่ต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์และทำให้การจัดการในเรื่องการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสิ่งแวดล้อมการผลิตเป็นไปอย่างเหมาะสม ซึ่งส่งผลให้การควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในโรงงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ICMSF, 2002)



ภาพที่ 2.5 ตัวอย่างการแบ่งพื้นผิวสิ่งแวดล้อมการผลิตออกเป็นโซนต่างๆ (ICMSF, 2002)

สิ่งแวดล้อมการผลิตในโรงงานผลิตอาหาร มักจะมีเศษอาหารติดอยู่ทำให้ภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและแพร่ขยายของจุลินทรีย์ ไปยังส่วนต่างๆของโรงงานรวมทั้งผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย ดังนั้นจึงต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์สู่ผลิตภัณฑ์ สุวิมล กิรติพิบูล (2545) สรุปว่าวัตถุประสงค์ของการล้างประกอบด้วยการลดปริมาณสัมบูรณ์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน การกำจัดแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการแพร่พันธุ์ของจุลินทรีย์ การเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ การเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่องจักรอุปกรณ์ และเป็นการยกระดับความปลอดภัยและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ในการทำความสะอาด สารชะล้างจะช่วยกำจัดเศษอาหารและสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บนพื้นผิวหน้าของเครื่องจักรอุปกรณ์ให้หลุดออกได้ง่ายขึ้น จากนั้นจึงฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมหรือใช้ความร้อนอย่างเพียงพอในการกำจัดจุลินทรีย์ที่ตกค้างอยู่

2.4 การควบคุมและยับยั้ง (Inactivation) *Listeria* (Gilbert et al., 2009)

ในการควบคุมและยับยั้ง *Listeria* มีปัจจัยสำคัญ ดังนี้

อุณหภูมิ: การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 70°C สามารถทำลาย *Listeria* ได้อย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 50°C ค่า D-value (decimal reduction time) ของ *Listeria* จะใช้เวลาหลายชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C ค่า D-value ของ *Listeria* จะอยู่ที่ 5-10 นาที และที่อุณหภูมิ 70°C ค่า D-value อยู่ที่ประมาณ 10 วินาที

ความเป็นกรดต่าง (pH): การปรับ pH ให้มีค่าต่ำกว่า 4.4 จะสามารถยับยั้งและทำลาย *Listeria* ได้ ซึ่งอัตราการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใช้และอุณหภูมิ โดย organic acid เช่น acetic acid จะมีประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อได้ดีกว่า mineral acid เช่น hydrochloric acid และอัตราการยับยั้งจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

Water activity (a_w): *Listeria* สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ในสิ่งแวดล้อมที่แห้งหรือมีค่า water activity ต่ำได้เป็นเวลานาน ซึ่งปริมาณตัวถูกละลาย เช่น เกลือ เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงต่อค่า water activity ของสารละลาย โดยค่า water activity จะแปรผกผันกับปริมาณตัวถูกละลายหรือความเข้มข้นของสารละลาย Hudson (1992) ได้ศึกษาผลของเกลือที่ความเข้มข้น 6, 16 และ 26% น้ำหนัก/ปริมาตรเกลือ NaCl ต่อการอยู่รอดของ *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่ 10°C, 2°C (ในตู้แช่เย็น) และ -18°C (ในตู้แช่แข็ง) พบว่าในระยะเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของสารละลายเกลือที่ทดสอบไม่สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้ และที่ระยะเวลา 33 วัน เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ในสารละลายเกลือที่ความเข้มข้น 6% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็น 16% พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ได้ แต่เชื้อยังมีจำนวนคงที่ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเกลือเป็น 26% จึงพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลง ซึ่งถึงแม้ว่า *L. monocytogenes* ถูกทำลายที่ความเข้มข้นเกลือ 26% แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการยับยั้ง *Listeria* แต่อัตราการลดลงของเชื้อที่ช้าแสดงให้เห็นว่าการทำลาย *Listeria* โดยควบคุมความเข้มข้นของสารละลายไม่ได้เป็นวิธีการทำลายเชื้อที่มีประสิทธิภาพ

สารถนอมอาหาร (Preservatives): ในผลิตภัณฑ์ผัก สามารถยับยั้งและทำลาย *Listeria* ได้โดยการใช้เอนไซม์ lysozyme ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และการใช้สารถนอมอาหารประเภทเกลือ ที่ควบคุมค่า pH อยู่ที่ 5.0 ได้แก่ เกลือ sodium benzoate เข้มข้น 0.2%, เกลือ sodium propionate เข้มข้น 0.25-0.3% ซึ่งประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อจะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง และเกลือ potassium sorbate เข้มข้น 0.2-0.3% สำหรับผลิตภัณฑ์ซาลามี

(salami) จะเติมสารไนไตรท์ (nitrite) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามอาจใช้การลดค่า pH ร่วมด้วย เนื่องจากการเติมสารไนไตรท์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ควบคุมเชื้อได้ดีเพียงพอที่อุณหภูมิ 37°C ส่วนผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ประเภทอื่นๆ ก็สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยการเติมสารไนไตรท์เข้มข้น 70-140 ppm และการควบคุมค่า pH ให้อยู่ที่ 6.0-6.3 รวมทั้งการเติมสารไนไตรท์รวมกับการใช้เกลือ sodium ascorbate เข้มข้น 0.042% (Duffy et al., 1994)

การฉายรังสี: การฉายรังสี Ultraviolet (UV) สามารถยับยั้งและทำลาย *Listeria* ได้ โดยค่า D-value ที่ใช้ในการฉายรังสีของ *Listeria* มีค่าอยู่ระหว่าง 0.34 – 2 kGy ซึ่งค่า D-value ที่ใช้ในการฉายรังสีของ *Listeria* ขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารและอุณหภูมิที่ใช้ในการฉายรังสี โดยในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มีค่า D-value สูงกว่าผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล (0.2-0.3 kGy)

สารฆ่าเชื้อ (Disinfectant): Van de Weyer และคณะ (1993) ได้ทดสอบสารฆ่าเชื้อ 9 ชนิด ได้แก่ สารฆ่าเชื้อในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก แอลกอฮอล์ และสารประกอบของ quaternary ammonium ในการฆ่าเชื้อ *L. monocytogenes* serotype 1/2a 1/2b 1/2c และ 4b รวมทั้ง *L. innocua* และ *L. welshimeri* พบว่าไม่มี *Listeria* สายพันธุ์ไหนที่ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารฆ่าเชื้อสามารถลดจำนวนเชื้อได้มากกว่า 5 log CFU ในระยะเวลา (contact time) 5 นาที และสารฆ่าเชื้อในกลุ่มแอลดีไฮด์ ไดโซคลอรีน และสารประกอบ quaternary ammonium มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงเมื่อมีสารอินทรีย์อยู่ด้วย Vasseur และคณะ (2001) พบว่าการใช้สารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (pH 10.5) ตามด้วยการใช้สารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรด (pH 5.4) จะเป็นการช็อกเชื้อ (pH shock) โดยมีประสิทธิภาพในการทำลาย *L. monocytogenes* ได้ถึง 3 log CFU

2.5 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกส่งออก

การส่งผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภคไปขายยังต่างประเทศนั้น ผู้ผลิตจำเป็นต้องปฏิบัติตามมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่กำหนดโดยกรมปศุสัตว์ และที่เป็นข้อตกลงระหว่างผู้ผลิตและกลุ่มลูกค้าในประเทศที่นำเข้าผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนไปกับผลิตภัณฑ์ได้ โดยมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกเพื่อการส่งออกของกรมปศุสัตว์ ประเทศญี่ปุ่น และสหภาพยุโรปมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.13

ตารางที่ 2.13 มาตรฐานด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุกเพื่อการส่งออก

จุลินทรีย์	ข้อกำหนด		
	กรมปศุสัตว์	ประเทศญี่ปุ่น	สหภาพยุโรป
Total plate count	$<1.0 \times 10^5$ CFU/g	$<3.0 \times 10^6$ CFU/g	< 4.0 CFU/cm ²
Enterobacteriaceae	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	< 2.0 CFU/cm ²
Coliform	< 500 MPN/g	ต้องไม่พบ	ไม่ระบุ
Faecal <i>Streptococcus</i>	< 100 CFU/g	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
<i>Escherichia coli</i>	ต้องไม่พบ	< 100 CFU/g	n = 5 c = 2 m = 50 M = 500
<i>Staphylococcus aureus</i>	ต้องไม่พบ	< 1000 CFU/g	n = 5 c = 2 m = 100 M = 5000
<i>Salmonella</i> spp.	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ไม่พบในตัวอย่าง 10 g จำนวน 5 ตัวอย่าง
<i>Clostridium</i> spp.	ไม่ระบุ	< 1000 CFU/g	ไม่ระบุ
<i>C. perfringens</i>	ต้องไม่พบ	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
<i>Listeria</i> spp.	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ต้องไม่พบ
<i>L. monocytogenes</i>	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ไม่ระบุ

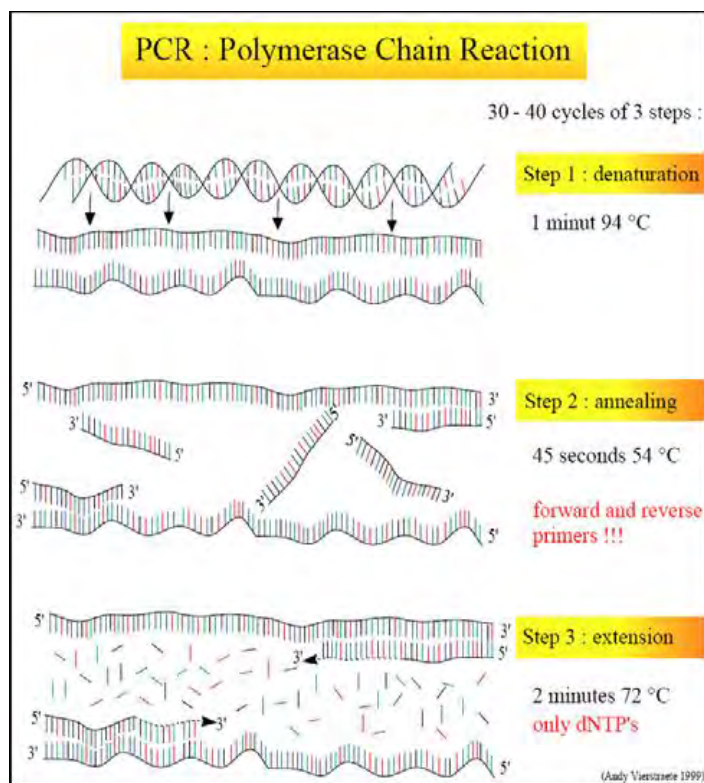
n = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด, c = จำนวนตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่างค่า m และ M หากตัวอย่างทั้งหมดที่ปริมาณเชื้อไม่เกิน m หรือตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อในช่วง m ถึง M มีจำนวนไม่เกิน c ตัวอย่างถือว่าผ่านมาตรฐาน หากมีตัวอย่างใดตัวอย่างหนึ่งมีปริมาณเชื้อเกิน M ถือว่าไม่ผ่านมาตรฐาน

สำหรับมาตรฐานเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุก พร้อมมบริโภคน Codex Committee on Food Hygiene ได้กำหนดให้อาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Listeria* (มากกว่า 0.5 log CFU/g) ต้องไม่พบเชื้อนี้ในตัวอย่างอาหาร 25 กรัม และสำหรับอาหารแช่แข็งซึ่งจัดอยู่ในอาหารที่ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญเติบโต (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 log CFU/g) ให้พบ *L. monocytogenes* ได้ไม่เกิน 100 cfu /25 กรัม (Nørrung, 2000) สำหรับมาตรฐานของประเทศไทย กรมปศุสัตว์กำหนดว่าจะต้องไม่พบ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปริมาณ 25 กรัม แต่ในผลิตภัณฑ์ที่จะส่งไปยังประเทศทั้งในกลุ่มยุโรปและญี่ปุ่น มาตรฐานของกลุ่มลูกค้าจะระบุให้ต้องไม่พบ *Listeria* spp. ไม่ว่าจะเป็ชนิดใดก็ตาม

จะเห็นว่ามาตรฐานด้านจุลินทรีย์โดยเฉพาะมาตรฐานที่เกี่ยวกับ *Listeria* spp. จะมีความเข้มงวดมาก เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นโรงงานผลิตจำเป็นต้องมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ประกอบด้วยทำให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสม และการป้องกันการปนเปื้อนภายหลังการให้ความร้อนโดยดูแลให้การล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวสิ่งแวดล้อมการผลิตเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

2.6 ทฤษฎีและหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (จรรยา ชมวารินทร์ และคณะ, 2540; พจน์ ศรบุญลือ และคณะ, 2540; มนตรี จุฬาวัดมนตรี และคณะ, 2542; วสันต์ จันทร์ทาทิตย์ และคณะ, 2539)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ยีนที่ต้องการและเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมได้หลายล้านเท่า โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า In vitro enzymatic gene amplification ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะ ในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA Polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (DNA template) ส่วนประกอบต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ 1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 2. Thermostable DNA polymerase 3. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxyguanine triphosphate (dGTP), deoxythymine triphosphate (dTTP) และ deoxycytosine triphosphate (dCTP) 4. Oligonucleotide primer 5. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ดังภาพที่ 2.6)



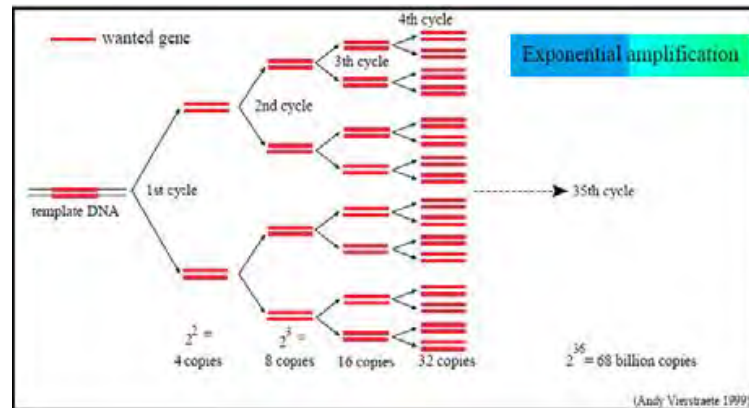
ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Vierstraete, 1999)

ขั้นตอนการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสประกอบด้วย

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C
2. ขั้นตอน Primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 °C เพื่อให้ไพรเมอร์ (primer) สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สมได้
3. ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของไพรเมอร์แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5 ไป 3 โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Taq polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 °C

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของ

ทุกๆ รอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า ลักษณะการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR แสดงดังในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 รูปแบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Vierstraete, 1999)

การเตรียมและขั้นตอนของทำ PCR

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่น เลือด สารน้ำต่างๆ ชี้นเนื้อ อาจเป็น Fix paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็น DNA หรือ RNA ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆและรวดเร็ว สามารถสกัดเอาดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆได้ เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูงและอาศัยดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆได้ รวมทั้งสามารถเลือกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอช่วงสั้นได้ดี

2. ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA)

ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA Target) สามารถใช้ในปฏิกิริยา PCR ในลักษณะดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่จุดที่มีปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

3. นิวคลีโอไทด์ตั้งต้น (Primer)

การเลือกออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงาน โดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหาคู่กับไพรเมอร์ โดยลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ของไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ไพรเมอร์

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่

- 1.) ความยาวของไพรเมอร์ ควรยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
- 2.) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกลายของเบสอย่างสม่ำเสมอ
- 3.) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีปริมาณเบส GC อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีปริมาณเบส GC ที่สูงเกินไป
- 4.) ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบนั้น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5.) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
- 6.) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง
- 7.) ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง $55-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 8.) ไพรเมอร์ควรมีลำดับคู่สมกับปลาย 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

1. Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ *Taq* DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูงคือ $70 - 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติ 3-5 exonuclease activity จึงขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่เรียกว่า proofreading ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0 - 2.5 unit ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ, ไพรเมอร์ รวมทั้งสารประกอบอื่นๆด้วย การใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 μM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง aliquot เก็บที่ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

6. บัฟเฟอร์ (Buffer)

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl, KCl, MgCl_2 และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆ ในบัฟเฟอร์มีดังนี้

6.1 ความเข้มข้นของไอออน Magnesium (Mg^{2+})

Taq DNA polymerase ต้องการไอออน magnesium เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดยไอออน magnesium จะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ รวมทั้งไอออน magnesium ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของไอออน Magnesium คือต้องเหลือ magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5-1.0 mM โดยทั่วไปมักใช้ magnesium ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของไอออน magnesium ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และการปรับค่าไอออน magnesium จะช่วยให้ไพรเมอร์มีการ anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

6.2 pH

pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ Taq DNA polymerase คือที่ 7 - 7.5 ที่อุณหภูมิ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ แต่ปกติ Taq DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ เนื่องจาก pH ของ Tris buffer จะลดลงประมาณ 0.3 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศา ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ จะได้ pH 7.3

6.3 องค์ประกอบอื่นในปฏิกิริยา PCR

โดยทั่วไปส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ใน PCR คือ 10-15 mM Tris-HCl ที่ pH 8.4 ที่ $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.01% เจลาติน (W/V) หรืออาจใช้ non-ionic detergent อื่นแทนเจลาตินได้ เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การทดลองบางแห่งใช้ DMSO ใส่ลงไปในการปฏิกิริยาเพื่อลด secondary structure ของดีเอ็นเอ แต่พบว่า 10% DMSO ไม่เหมาะสมกับ Taq DNA polymerase เพราะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่น้อยลง เจลาตินหรือ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) สามารถช่วยคง

สภาพเอนไซม์ได้ แต่ BSA ถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง และอาจตกตะกอนกับ *Taq* DNA polymerase

การทำ PCR อาศัยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (Temperature cycling) ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วย

1. ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ประมาณ 94-95°C เป็นเวลานาน 30-60 วินาที อย่างไรก็ตามการใช้เวลานานและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จะทำให้เอนไซม์และนิวคลีโอไทด์สูญเสียคุณสมบัติได้ แต่ถ้าใช้เวลาน้อยและอุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกันไม่ได้ ทำให้ผลผลิต PCR ลดลง กรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบมีปริมาณ GC ที่สูงมาก ต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นด้วย

2. ขั้นตอน Primer annealing โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ประมาณ 55-72°C ซึ่งใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่ต่ำกว่า T_m ของไพรเมอร์ประมาณ 5°C การใช้อุณหภูมิที่สูงในขั้นตอนนี้จะช่วยเพิ่มความจำเพาะในการจับคู่ เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประมาณ 30 วินาที

3. ขั้นตอน Primer extension เวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72°C โดยปกติ *Taq* DNA polymerase สามารถเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอได้ประมาณ 6,000 นิวคลีโอไทด์ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 72°C การใช้เวลาที่มากในขั้นตอนนี้แรกจะมีประโยชน์สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีจำนวนน้อย

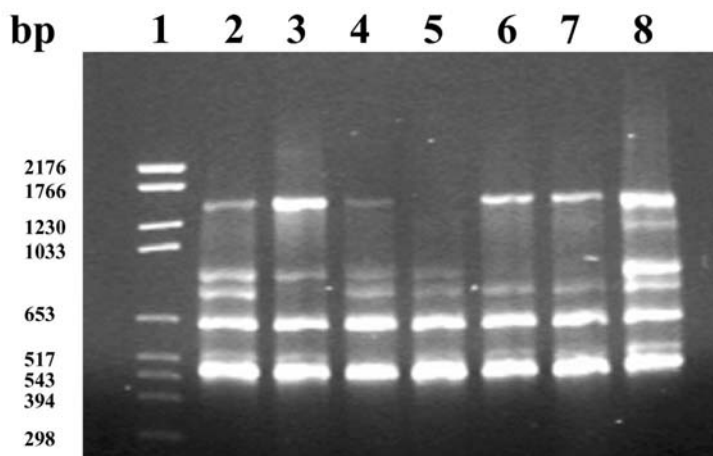
จำนวนรอบในการทำ PCR (cycle number)

จำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตั้งต้น ยิ่งใช้จำนวนรอบมากขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะได้ผลผลิต PCR ผิดพลาดก็มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากผลผลิต PCR ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงที่น้อยลง และมี background มากขึ้น แต่ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไป ผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงด้วย

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตมีด้วยกันหลายวิธี ที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ

1. *Gel electrophoresis* โดยนำผลผลิต PCR ที่สร้างได้มาแยกตามขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน จากนั้นย้อมสีดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต ภาพที่ได้แสดงดังในภาพที่ 2.8 ผลผลิต PCR ที่ดีควรให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจน และตรงตามขนาดความต้องการ แต่ถ้ามีขนาดเล็กและแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน อาจเป็นดีเอ็นเอที่เป็น primer dimer



ภาพที่ 2.8 ผลผลิต RAPD-PCR ของ *L. monocytogenes* ที่วิเคราะห์ด้วยหลักการ gel electrophoresis (Wernars et al., 1991)

2. *Nucleic acid hybridization* ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจน สามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรึงกับแผ่น nitrocellulose หรือแผ่น nylon แล้วนำมาทำ southern blot, dot blot หรือ slot bolt โดยอาศัยตัวติดตาม (probe) ที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลดรังสี แล้วจึงนำผลไปดูการจับของผลผลิต PCR กับตัวติดตามได้

3. *Direct sequencing* ในกรณีตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของผลผลิต PCR สามารถตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing PCR ที่เป็นสายคู่ (double strand PCR products) หรืออาจจะ sequencing PCR ที่เป็นสายเดี่ยว (single stranded PCR products)

ข้อควรระวังในการทำ PCR: การปนเปื้อน

ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR นี้ จะเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้หลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การสกัดแยกดีเอ็นเอหรือจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (aerosol) ที่มักเกิดขึ้นขณะการเปิด-ปิดฝาหลอดและการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิวหนัง เส้นผม และมีผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้นจึงควรมีการระวังการปนเปื้อนให้มากโดยเฉพาะการปนเปื้อนชนิด carry - over contamination

วิธีการที่จะป้องกันการปนเปื้อนมีด้วยกันหลายอย่างเช่น

- 1) ควรแบ่งพื้นหรือห้องทำงานในช่วงก่อนและหลังทำ PCR
- 2) แบ่งสารเคมีหรือน้ำยาลงในหลอดเล็กๆ (Aliquot) เพื่อให้การนำมาใช้แต่ละครั้งไม่ปนกัน
- 3) ใช้ Micropipette และ Filter tip ซึ่งเป็นทีปชนิดพิเศษที่ป้องกันการแพร่กระจายของละอองลอย โดยมีลักษณะสำคัญคือ มีไส้กรอง (membrane) อยู่ภายใน
- 4) มีตัวควบคุมที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยตัวควบคุมจะมีด้วยกัน 3 แบบ คือ แบบแรกเป็นตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (no template) เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของสารที่ใช้ (negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (negative control) และแบบที่สามเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอต้นแบบอยู่ (positive control)
- 5) การปฏิบัติงานด้วยขบวนการปราศจากเชื้อ (Sterile technique) และด้วยความระมัดระวัง เช่นการสวมถุงมือและเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ
- 6) ลดขั้นตอนย้ายถ่ายสารละลาย เช่น ลดขั้นตอนการใช้ปิเปต โดยการทำ master mix เมื่อต้องทำ PCR หลายตัวอย่าง

2.7 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) แบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งไม่จำเพาะกับยีนใด แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการ electrophoresis บนเจล agarose หรือ polyacrylamide เทคนิค RAPD ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ผลที่รวดเร็ว สามารถทำซ้ำได้ ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยประมาณ 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา (Winter and Kahl, 1995)

Kerouanton et al. (1998) ได้ศึกษาการจำแนก *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี RAPD เปรียบเทียบกับวิธี PFGE, restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA (ribotyping), electrophoretic typing of esterases (zymotyping) และ serotyping พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 35 isolates วิธี RAPD สามารถวิเคราะห์รูปแบบได้ 13 รูปแบบโดยใช้เพียง 1 primer (5' ACGTATCTGC 3') ในขณะที่วิธี PFGE วิเคราะห์ได้ 12 รูปแบบ วิธี ribotyping

ตารางที่ 2.14 การจำแนก *L. monocytogenes* 35 สายพันธุ์โดยเทคนิค serotype, zymotype, RAPD, PFGE และ ribotype (Kerouanton et al., 1998)

ลำดับสายพันธุ์	Serotype	Zymotype	RAPD	PFGE	Ribotype
1	4b	Z6	I	1	I
2	4b	Z6	I	1	II
3	4b	Z6	I	1	II
4	4b	Z6	I	2	II
5	4b	Z6	I	3	II
6	4b	Z7	II	4	III
7	4b	Z7	II	4	III
8	4b	Z7	II	4	III
9	4b	Z6	II	4	III
10	4b	Z8	II	4	III
11	4b	Z7	II	4	II
12	4b	Z7	II	4	IV
13	4b	Z7	II	4	IV
14	4b	Z7	II	4	V
15	1/2a	Z1	IV	5	V
16	1/2a	Z1	V	5	V
17	1/2a	Z5	VI	12	IV
18	1/2a	Z2	VII	5	III
19	1/2a	Z1	XII	9	X
20	1/2a	Z1	XII	5	IV
21	1/2a	Z2	VIII	6	III
22	1/2a	Z2	IX	6	II
23	1/2a	Z2	X	6	IV
24	1/2a	Z2	XI	6	VII
25	1/2a	Z1	XII	6	VIII
26	1/2a	Z1	XIII	6	II
27	1/2c	Z3	III	11	IV

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) การจำแนก *L. monocytogenes* 35 สายพันธุ์โดยเทคนิค serotype, zymotype, RAPD, PFGE และ ribotype (Kerouanton et al., 1998)

ลำดับสายพันธุ์	Serotype	Zymotype	RAPD	PFGE	Ribotype
28	1/2c	Z3	III	7	IV
29	1/2c	Z3	III	7	III
30	1/2c	Z3	III	7	III
31	1/2c	Z3	III	7	VII
32	1/2c	Z3	III	11	VI
33	1/2c	Z3	III	9	VI
34	1/2	Z4	III	10	IV
35	1/2c	Z3	III	8	IX

มีรายงานการใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของ *Listeria* ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น Niederhauser et al., 1994 ใช้เทคนิค RAPD ในการติดตามการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อกึ่งสุกพร้อมบริโภคจากร้านขายเนื้อถึงโรงงานผลิต Chambel et al., 2007 ติดตามการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์นมภายในโรงงานผลิต Giovannacci et al., 1999 ติดตามการปนเปื้อนและศึกษาเชิงระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของ *L. monocytogenes* ในโรงเชือดและส่วนตัดแต่งเนื้อหมู

2.8 การประเมินความเสี่ยง

การประเมินความเสี่ยงเป็นขั้นตอนหนึ่งของการวิเคราะห์ความเสี่ยง (risk analysis) โดยโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) ได้ให้นิยามของความเสี่ยง (risk) ว่าหมายถึงโอกาสในการเกิดผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพและความรุนแรงของผลกระทบนั้นซึ่งสืบเนื่องมาจากอันตรายในอาหาร (CAC, 1999) ภายใต้กรอบของ Codex Alimentarius Commission (CAC) กำหนดไว้ว่าการวิเคราะห์ความเสี่ยงนั้นประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ประการ คือ (Hoorstra and Notermans, 2001)

1. การประเมินความเสี่ยง (risk assessment) หมายถึงกระบวนการประเมินโอกาสที่จะเกิดผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพของมนุษย์
2. การสื่อสารความเสี่ยง (risk communication) เป็นการสื่อสารถึงอันตรายที่มีโอกาสเกิดขึ้น ระหว่างผู้ประเมินความเสี่ยง (risk assessor) และผู้จัดการความเสี่ยง (risk manager) ซึ่งถือเป็นส่วนสำคัญ เพราะระหว่างผู้ประเมินความเสี่ยงและผู้จัดการความเสี่ยงอาจมีมุมมองความเห็นที่แตกต่างกัน
3. การจัดการความเสี่ยง (risk management) เป็นการจัดการความเสี่ยงหรืออันตรายที่เกิดขึ้น หรือการตัดสินใจในการจัดการสิ่งที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยพิจารณาทางเลือกในการจัดการที่เหมาะสมจากผลการประเมินความเสี่ยง

การประเมินความเสี่ยง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้ (CAC, 1999)

(1) การระบุอันตราย (hazard identification) เป็นการระบุสิ่งที่เป็นเคมี ชีวภาพ และกายภาพ ที่อาจปรากฏอยู่ในอาหารที่เฉพาะเจาะจงหรือในกลุ่มของอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยการระบุอันตรายทางชีวภาพนั้นต้องอธิบายลักษณะของจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย ลักษณะทางอนุกรมวิธาน การแบ่งกลุ่ม การแพร่กระจายในสัตว์และมนุษย์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอด รวมทั้งการรวบรวมสถิติการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละกลุ่ม เพื่อศึกษาการกระจายของจุลินทรีย์ในอาหารต่างๆ

(2) การอธิบายอันตราย (hazard characterization) เป็นการหาระดับและ/หรือปริมาณของผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพของผู้บริโภคที่มีความสัมพันธ์กับอันตรายที่ได้รับสัมผัส โดยใช้การประเมินการตอบสนองต่อปริมาณอันตราย (dose-response assessment) ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดการสัมผัสของสิ่งที่เป็นเคมี ชีวภาพ หรือกายภาพกับความรุนแรงและ/หรือความถี่ที่ก่อให้เกิดผลกระทบที่มีผลด้านลบต่อสุขภาพ สำหรับการประเมินความเสี่ยงของจุลินทรีย์จะเป็นการหาความสัมพันธ์โดยใช้ปริมาณจุลินทรีย์หรือสารพิษของจุลินทรีย์ก็ได้

ในการประเมินความเสี่ยงของจุลินทรีย์ มีงานวิจัยหลายงานที่อธิบายอันตรายโดยการอธิบายการติดเชื้อของจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย กลไกการก่อให้เกิดโรค ปัจจัยเกี่ยวกับมนุษย์ที่มีผลต่อการติดเชื้อ ปัจจัยเกี่ยวกับภาวะในการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย และอาการหรือความเจ็บป่วยที่เกิดจากจุลินทรีย์ และรวบรวมสถิติของประชากรที่เจ็บป่วยและข้อมูลลักษณะการเจ็บป่วย รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของการสัมผัสกับจุลินทรีย์ กับความรุนแรงและ/หรือความถี่ที่ก่อให้เกิดการเจ็บป่วย เพื่อประเมินการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัส (exposure) กับจุลินทรีย์

(3) **การประเมินการสัมผัส (exposure assessment)** เป็นการหาระดับและ/หรือปริมาณของสิ่งที่เป็นเคมี ชีวภาพ หรือกายภาพ ที่น่าจะมีในอาหาร รวมถึงโอกาสที่ผู้บริโภคจะได้รับสัมผัส

(4) **การอธิบายความเสี่ยง (risk characterization)** เป็นการประมาณโอกาสการเกิดและความรุนแรงของผลกระทบด้านลบที่จะเกิดต่อสุขภาพในประชากรกลุ่มใดๆ ทั้งในเชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณ ซึ่งได้จากการระบุอันตราย การอธิบายอันตราย และการประเมินการสัมผัส

ในแต่ละขั้นตอนของการประเมินความเสี่ยงต้องจัดทำภายใต้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ และมีแนวความคิดร่วมกับสภาพทางเศรษฐกิจ จริยธรรม สาธารณสุข และกฎหมาย เพื่อความเข้าใจอย่างแท้จริงของความเสี่ยงนั้นๆ (Foegeding, 1997) ซึ่งการประเมินความเสี่ยงของ *L. monocytogenes* มีรายละเอียดโดยสรุปดังต่อไปนี้ (WHO/FAO, 2004)

การระบุอันตราย

โรค listeriosis มีโอกาสพบค่อนข้างยากแต่เมื่อเป็นแล้วจะมีความรุนแรงและมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง (20-30%) เมื่อเปรียบเทียบกับโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นที่พบในอาหาร เช่น *Salmonella* โรค listeriosis มีผลกระทบต่อประชากรบางกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อโรคนั้นมากกว่าประชากรทั่วไป โดยมี *L. monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคนั้นในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคหรือมีภาวะร้ายแรงที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน หญิงมีครรภ์ ทารกในครรภ์หรือแรกเกิด เส้นทางการหลักของการถ่ายทอด (transmission) ของ *L. monocytogenes* สู่คนคือการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน โดย *L. monocytogenes* มักพบในอาหารทั้งจากพืชและสัตว์ที่ไม่ได้ผ่านการปรุงสุก แต่อาหารที่ผ่านการปรุงสุกแล้วก็มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ถ้าการปรุงสุกนั้นมีการให้ความร้อนไม่เพียงพอหรือเป็นการปนเปื้อนหลังกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อมภายในโรงงานผลิตอาหารด้วย ซึ่งปัจจัยสำคัญของโรค listeriosis คือ *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคนั้นสามารถเจริญเติบโตและ

เพิ่มจำนวนได้ในที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็น ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในอาหารหลากหลายประเภท แต่ในเหตุการณ์การระบาดครั้งใหญ่หรือการป่วยเป็นรายๆ (sporadic case) นั้น ส่วนใหญ่เกิดจากอาหารประเภทพร้อมบริโภค ซึ่งเป็นประเภทอาหารที่เป็นกลุ่มใหญ่และมีความหลากหลาย สามารถแบ่งประเภทของอาหารพร้อมบริโภคเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับลักษณะนิสัยท้องถิ่นในการบริโภค ความสามารถในการหาได้ (availability) และความสมบูรณ์ (integrity) ของห่วงโซ่แช่เย็น (chill chain) และข้อกำหนดต่างๆ โดยถึงแม้ว่าโรค listeriosis เป็นโรคที่มีโอกาสพบยาก มีอัตราการพบประมาณ 0.1 ถึง 11.3 คนต่อประชากรล้านคน (Notermans et al., 1998) แต่ความรุนแรงของโรคและเหตุการณ์การระบาดที่มักเกี่ยวข้องกับอาหารพร้อมบริโภคที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมแสดงให้เห็นว่าการเกิดโรค listeriosis ส่งผลกระทบต่อสังคมและเศรษฐกิจสูงที่สุดในบรรดาโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นที่พบในอาหาร (foodborne diseases) (Roberts, 1989; Roberts and Pinner, 1990)

การอธิบายอันตราย

การอธิบายอันตรายจะพิจารณารายละเอียดของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและผู้ได้รับเชื้อ (host) ผลกระทบทางสาธารณสุขของการเกิดโรค อาหารที่มักเกี่ยวข้องกับโรค listeriosis และความสัมพันธ์ของการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับจุลินทรีย์ (dose-response relation)

โรค listeriosis แบ่งตามลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ประเภท คือ แบบ invasive และ แบบ non-invasive ซึ่งโรค listeriosis แบบ invasive จะเกิดการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อของลำไส้ และลุกลามไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น รกของเด็กในครรภ์ ระบบประสาทส่วนกลาง เลือด หรือหลายส่วนร่วมกัน ทำให้มีผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูง (Mead et al., 1999) ส่วนเหตุการณ์การระบาดของโรค listeriosis แบบ non-invasive ก็พบหลายครั้ง โดยหลังจากรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อได้ไม่นาน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ก็มีอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องร่วง ปวดศีรษะ เป็นไข้ และปวดกล้ามเนื้อ (Dalton et al., 1997; Salamina et al., 1996; Riedo et al., 1994; Aureli et al., 2000) ผู้ป่วยในเหตุการณ์การระบาดมักเกิดจากการได้รับเชื้อ *L. monocytogenes* ในปริมาณมากถึงแม้ว่าบุคคลนั้นจะมีสุขภาพแข็งแรงดีก็ตาม ซึ่งอัตราการเกิดและปัจจัยของการเกิดโรค listeriosis แบบ non-invasive ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงของ *L. monocytogenes* จึงพิจารณาเฉพาะโรค listeriosis แบบ invasive เป็นผลลัพธ์ของการได้รับสัมผัสอันตราย

อาหารที่เกี่ยวข้องกับเหตุการณ์การระบาดของโรค listeriosis ได้แก่ Hispanic-style soft cheese (*queso fresco*), mould-ripened cheese, hot dog (frankfurter), ลี้นหมูในเจลลี่ เนื้อแปรรูป ตับบด ซาลามี นมพาสเจอร์ไรซ์ นมที่ไม่ได้พาสเจอร์ไรซ์ เนย กุ้งปรุงสุก หอยแมลงภู่รวมควัน ปลารวมควัน สลัดมันฝรั่ง ผักสดและโคลสลอว์ (coleslaw) ในกรณีผู้ป่วยเป็นรายๆ พบเกี่ยวข้องกับการบริโภคน้ำนมดิบ ไอศกรีมที่ไม่ได้พาสเจอร์ไรซ์ ricotta cheese ซีสจากนมแพะและแกะ mould-ripened cheese, Hispanic-style cheese, hot dog, ซาลามี เห็ดดองเค็ม ไข่ปลาเค็ม (cod) รวมควัน หอยแมลงภู่รวมควัน ปลาที่ปรุงไม่สุก มะกอกดอง ผักสดและโคลสลอว์ โดยปริมาณของ *L. monocytogenes* ที่พบในอาหารที่บริโภคเข้าไปแล้วก่อให้เกิดโรคมียามีปริมาณอยู่มากกว่า 10^3 CFU ต่อกรัม (FSA/FSIS, 2001) แต่ก็มีรายงานพบการเกิดโรคจาก *L. monocytogenes* ที่มีปริมาณต่ำกว่า 10^3 CFU ต่อกรัม แต่อย่างไรก็ตามยังมีความไม่แน่นอนของการประมาณปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากปริมาณจริงของเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่บริโภคเข้าไปโดยผู้ป่วยแปรผันตามปริมาณอาหารที่ผู้ป่วยบริโภค

การตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยของกลุ่มประชากรต่อขนาดการสัมผัสกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในอาหารขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย สะท้อนให้เห็นว่าการเกิดโรค listeriosis ก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัยเช่นกัน เช่น องค์ประกอบของอาหาร ความรุนแรงของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ปริมาณเชื้อที่ได้รับ และสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันของผู้ที่ได้รับเชื้อ ซึ่งโดยทั่วไปนักวิจัยจะขาดข้อมูลในส่วนนี้ เนื่องจากเป็นการผิดศีลธรรมที่จะทดลองให้คนบริโภคจุลินทรีย์เข้าไป แล้วหาโอกาสในการเจ็บป่วย นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคนี้ยังมีความแตกต่างกันในด้านเพศ อายุ ความแข็งแรงของร่างกาย จึงทำให้การเจ็บป่วยเมื่อได้รับจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและประเมินความสัมพันธ์ของการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับจุลินทรีย์ โดยการอ้างอิงจากประสบการณ์ของผู้เชี่ยวชาญ ข้อมูลเชิงระบาดวิทยาหรือการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับประเมินการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับจุลินทรีย์ ซึ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามารถใช้ประเมินโอกาสในการเจ็บป่วยได้ในระดับประชากรเท่านั้น ไม่สามารถใช้อ้างอิงการเกิดโรคในรายบุคคลได้

แบบจำลองความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อขนาดการสัมผัสกับจุลินทรีย์อาจครอบคลุมถึงการตอบสนองทางชีวภาพ (biological end-points) ต่างๆ เช่น การติดเชื้อ การป่วย (morbidity) และการเสียชีวิต (mortality) ซึ่งประเมินได้จากข้อมูลเชิงระบาดวิทยาในคน ดังแสดงในตารางที่ 2.15 ซึ่งทุกแบบจำลองสร้างจากสมมติฐานที่ว่าจุลินทรีย์แต่ละเซลล์ส่งผลกระทบบ่อย่างเป็นอิสระต่อกันและจุลินทรีย์เพียงหนึ่งเซลล์ก็สามารถก่อให้เกิดการเจ็บป่วยได้

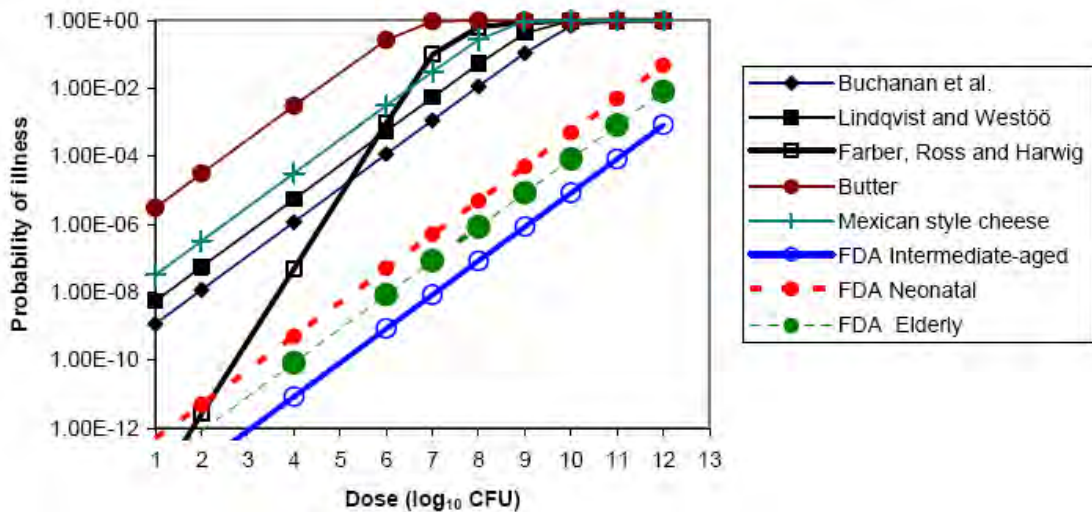
ตารางที่ 2.15 ตัวอย่างแบบจำลองความสัมพันธ์ของการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับ *L. monocytogenes* (WHO/FAO, 2004)

แบบจำลอง และงานวิจัย	การตอบสนองทางชีวภาพ	รายละเอียด
Exponential (Buchanan et al., 1997)	การป่วยที่รุนแรง อ้างอิงจากสถิติการเกิด	อ้างอิงจากการประมาณในบุคคลที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ และทุกกรณีเกิดจากการบริโภคอาหารประเภทเดียวกัน ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการป่วยประมาณได้เท่ากับ 5.9×10^9 CFU
Exponential (Lindqvist and Westöö, 2000)	โรคประจำปีและข้อมูลสำรวจทางอาหาร	อ้างอิงจากการประมาณในบุคคลที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ และทุกกรณีเกิดจากการบริโภคอาหารประเภทเดียวกัน ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการป่วยประมาณได้เท่ากับ 1.2×10^9 CFU
Weibull-Gamma (Farber, Ross and Harwig, 1996)	การติดเชื้ออย่างรุนแรงในคน อ้างอิงจากประสบการณ์จากผู้เชี่ยวชาญ	ประมาณปริมาณเชื้อที่ประชากรร้อยละ 50 จะติดเชื้อ โดยปริมาณเชื้อที่ทำให้มีความเสี่ยงต่ำในการติดเชื้อเท่ากับ 4.8×10^5 CFU และปริมาณเชื้อที่มีความเสี่ยงสูงเท่ากับ 4.8×10^7 CFU
Exponential (FDA/FSIS, 2001)	การป่วยที่รุนแรง วิเคราะห์จากข้อมูลเหตุการณ์การระบาด	อ้างอิงจากเหตุการณ์ระบาดใน Finland จากการบริโภคเนย (butter) ผู้ป่วยอยู่ในกลุ่มประชากรที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ โดยประมาณปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการป่วยได้เท่ากับ 6.8×10^4 CFU

ตารางที่ 2.15 (ต่อ) ตัวอย่างแบบจำลองความสัมพันธ์ของการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับ *L. monocytogenes* (WHO/FAO, 2004)

แบบจำลอง และงานวิจัย	การตอบสนองทางชีวภาพ	รายละเอียด
Exponential (FDA/FSIS, 2001)	การป่วยเกิดอาการ Perinatal วิเคราะห์จากข้อมูลเหตุการณ์การระบาด	อ้างอิงจากเหตุการณ์ระบาดในหญิงตั้งครรภ์ในสหรัฐอเมริกา มีสาเหตุจากการบริโภค Hispanic-style cheese โดยปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการป่วยประมาณได้ 1.9×10^6 CFU
FDA/FSIS-General (FDA/FSIS, 2001)		เป็นแบบจำลองสำหรับประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 30 วันถึง 60 ปี ซึ่งประมาณจำนวนผู้ป่วย โดยเท่ากับจำนวนผู้เสียชีวิตที่ประมาณได้คูณ 5
FDA/FSIS-Neonates (FDA/FSIS, 2001)	การเสียชีวิต อ้างอิงจากอัตราการตายของสัตว์ทดลอง (หนู) และข้อมูลทางสถิติของการเสียชีวิตในคน	เป็นแบบจำลองสำหรับทารกในครรภ์และทารกแรกเกิดที่มีอายุน้อยกว่า 30 วัน โดยสมมติว่าเกิดการสัมผัสกับเชื้อในมดลูก (utero)
FDA/FSIS-Elderly (FDA/FSIS, 2001)		เป็นแบบจำลองสำหรับประชากรที่มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป ซึ่งประมาณจำนวนผู้ป่วยโดยเท่ากับจำนวนผู้เสียชีวิตที่ประมาณได้คูณ 5
Beta-Poisson และ Exponential (Haas et al., 1999)	การติดเชื้อในหนู	ทดลองฉีด <i>L. monocytogenes</i> ในหนู พบว่าการคัดเลือกค่าการตอบสนองของการเกิดโรคในคนเป็นไปได้ยากที่จะตัดสินจากการติดเชื้อในหนู

จากตารางที่ 2.15 แบบจำลอง exponential เป็นแบบจำลองแบบหนึ่งตัวแปร (single parameter) สร้างจากสมมติฐานที่ว่าทุกๆ เซลล์ของ *L. monocytogenes* ที่สัมผัสนั้นมีโอกาสเท่ากันที่จะก่อให้เกิดการเจ็บป่วยได้ โดยโอกาสการเจ็บป่วยจะประเมินได้เป็นตัวเลขค่าหนึ่งแบบจำลอง Beta-Poisson เป็นแบบจำลองแบบสองตัวแปรที่พิจารณาถึงความหลากหลายของปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับผู้สัมผัสจุลินทรีย์ด้วย (pathogen–host interaction) ทำให้ประเมินโอกาสการเจ็บป่วยได้ค่าที่หลากหลาย แบบจำลอง Weibull-Gamma เป็นแบบจำลองแบบสามตัวแปร โดยนอกจากจะพิจารณาความหลากหลายของปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับผู้สัมผัสจุลินทรีย์แล้ว ยังรวมถึงตัวแปรอื่นที่อาจส่งผลถึงรูปร่างกราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อขนาดสัมผัสกับจุลินทรีย์ โดยความสัมพันธ์ของโอกาสในการเจ็บป่วยกับขนาดการสัมผัสกับ *L. monocytogenes* ที่ได้จากการประมาณด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในตารางที่ 2.15 แสดงให้เห็นในรูปกราฟได้ดังภาพที่ 2.9 ซึ่งความแตกต่างของเส้นกราฟดังในภาพนี้เป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของชุดข้อมูลที่นำมาใช้ประมาณ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และเป้าหมายการตอบสนองที่ศึกษา



ภาพที่ 2.9 กราฟเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของโอกาสในการเจ็บป่วยกับปริมาณเชื้อที่ได้รับในงานวิจัยต่างๆ โดยประเมินจากข้อมูลเชิงระบาดวิทยาและประสบการณ์จากผู้เชี่ยวชาญ (WHO/FAO, 2004)

การประเมินการสัมผัส

การประเมินการสัมผัสของ *L. monocytogenes* จะประเมินความถี่ (frequency) และการพบ (incidence) *L. monocytogenes* ในอาหาร ณ จุดจำหน่ายอาหาร และประเมินโอกาสในการสัมผัสหรือปริมาณเชื้อที่ผู้บริโภคจะได้รับจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน ณ จุดที่บริโภค โดยการพัฒนาระบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อประเมินถึงการเจริญเติบโตหรือการลดลงของ *L. monocytogenes* ณ เวลาที่ซื้ออาหารนั้นถึงเวลาที่บริโภค โดยใช้ข้อมูลและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อประเมินอัตราการเจริญเติบโตและ lag time ของ *L. monocytogenes* ที่ได้รับอิทธิพลจากองค์ประกอบของอาหาร รวมทั้งระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารทั้งที่จุดจำหน่ายอาหารและในครัวเรือน

ในการประเมินโอกาสในการสัมผัสกับ *L. monocytogenes* ณ จุดที่บริโภค จะคำนวณปริมาณของ *L. monocytogenes* ที่บริโภคเข้าไปจริงจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน โดยการพิจารณาถึงปริมาณและความถี่ของการบริโภคอาหารนั้นด้วย ซึ่งอาหารประเภทพร้อมบริโภคที่มักเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารนั้น เป็นอาหารกลุ่มใหญ่ซึ่งมีความหลากหลายมาก เช่น ในอาหารแต่ละชนิดก็มีสภาวะและวิธีการเตรียมและการเก็บรักษาที่แตกต่างกันไป อาหารพร้อมบริโภคบางชนิดอาจสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ขณะที่อาหารพร้อมบริโภคบางชนิดก็ไม่ได้สนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ภายใต้สภาวะและระยะเวลาในการเก็บรักษาที่จำเพาะ ยกตัวอย่างเช่น นมที่พาสเจอร์ไรซ์แล้วจะมีโอกาสและระดับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่ต่ำ แต่คุณสมบัติของอาหารจัดเป็นอาหารที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างการเก็บรักษา ไอศกรีมก็มีโอกาสและระดับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่ต่ำคล้ายนมพาสเจอร์ไรซ์ แต่ไอศกรีมเป็นอาหารที่ไม่ได้สนับสนุนการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจากเก็บรักษาด้วยการแช่เยือกแข็ง ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแปรรูป (fermented meat product) เป็นอาหารที่มักพบปนเปื้อนด้วย *Listeria* และไม่มีขั้นตอนการทำลายเชื้อในกระบวนการผลิต แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาได้โดยการเติมสารถนอมอาหาร (preservatives) เช่น ไนไตรท์ (nitrite) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ปลารมควันเย็นก็มักพบปนเปื้อนด้วย *L. monocytogenes* เช่นกัน และไม่มีขั้นตอนการทำลายเชื้อในกระบวนการผลิต รวมทั้งเป็นอาหารที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างการเก็บรักษาด้วย

การอธิบายความเสี่ยง

การอธิบายความเสี่ยงจะใช้ผลลัพธ์ (output) ที่ได้จากการอธิบายอันตรายด้วยแบบจำลองการตอบสนองหรือโอกาสในการเจ็บป่วยต่อขนาดการสัมผัสกับ *L. monocytogenes* (dose-respond model) และจากการประเมินการสัมผัส เพื่อคาดคะเนโอกาสของการเกิดโรค listeriosis โดยผลลัพธ์ของการอธิบายความเสี่ยงจะอธิบายด้วยค่าประมาณความเสี่ยง (risk estimates) ของการเกิดโรคต่อหน่วยบริโภค (serving) ซึ่งจะใช้ค่าความเสี่ยงของการเกิดโรคต่อหน่วยบริโภคและปริมาณการบริโภคในการประมาณจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มประชากร จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อประชากร 10 ล้านคนต่อปีและจำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อหน่วยบริโภคของนมพาสเจอร์ไรซ์ ไอศกรีม ปลารมควัน และเนื้อหมักแปรรูป แสดงดังในตารางที่ 2.16 ยกตัวอย่างเช่นผลิตภัณฑ์นม ถึงแม้ว่าจะมีความเสี่ยงของการเกิดโรคต่อหน่วยบริโภคของอาหารจะมีค่าต่ำ โดยมีจำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ประมาณ 5×10^{-9} คนต่อหนึ่งหน่วยบริโภค แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์นมมีปริมาณการบริโภคสูงจึงเป็นผลให้ประมาณจำนวนผู้ป่วยของโรค listeriosis ต่อกลุ่มประชากรได้จำนวนมากกว่าอาหารชนิดอื่น ซึ่งตรงกันข้ามกับผลิตภัณฑ์ปลารมควัน ที่มีความเสี่ยงของการเกิดโรคต่อหน่วยบริโภคของอาหารอยู่ค่อนข้างสูง โดยมีจำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ประมาณ 2.1×10^{-8} คนต่อหนึ่งหน่วยบริโภค แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการบริโภคผลิตภัณฑ์ปลารมควันมีปริมาณปานกลาง ประมาณ 1 ถึง 18 หน่วยบริโภคต่อคนต่อปี จึงเป็นผลให้ประมาณจำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ในกลุ่มประชากรได้อยู่ในระดับปานกลาง

ตารางที่ 2.16 จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อประชากร 10 ล้านคนต่อปี และจำนวนผู้ป่วยต่อหน่วยบริโภค 1 ล้านหน่วยของตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค 4 ชนิด (WHO/FAO, 2004)

ชนิดอาหาร	จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อประชากร 10 ล้านคนต่อปี	จำนวนผู้ป่วยโรค listeriosis ต่อหน่วยบริโภค 1 ล้านหน่วย
นม	9.1	0.005
ไอศกรีม	0.012	0.000014
ปลารมควัน	0.46	0.021
เนื้อหมักแปรรูป	0.00066	0.0000025

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์

เนื้อไก่ปรุงสุกพร้อมบริโภค

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

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ปรุงสุก เนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง และจากการ swab พื้นผิวสิ่งแวดล้อมการผลิต

1. Incubator 30 ถึง 32 และ 35 ถึง 37°C (บริษัท Binder จำกัด)
2. Water bath (บริษัท Memmert จำกัด)
3. Loop และ Needle
4. ปิเปตขนาด 1 หรือ 10 มิลลิลิตร
5. หลอดทดลอง หรือขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
6. Petri dish
7. Glass slide
8. Stomacher
9. ตะเกียงแก๊ส

3.2.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *Listeria* spp. โดยวิธีทางอนุชีววิทยา

1. Incubator 37°C (บริษัท Binder จำกัด)
2. เครื่อง Centrifuge (บริษัท Hettich จำกัด)
3. เครื่อง Vortex mixer (บริษัท Scientific Industries จำกัด)
4. เครื่อง Micro-Centrifuge (บริษัท LabTech จำกัด)
5. Spectrophotometer (บริษัท Hitachi จำกัด)
6. Loop และ Needle
7. หลอดทดลองและฝาปิดหลอดทดลอง

8. ตะเกียงแก๊ส
9. Auto pipette ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร (บริษัท Biohit จำกัด)
10. Auto pipette ขนาด 5 มิลลิลิตร (บริษัท Biohit จำกัด)
11. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (บริษัท RBC Bioscience จำกัด)
12. เครื่อง Palm-Cycler (บริษัท Corbett Research จำกัด)
13. ชุดอุปกรณ์ Agilent DNA 7500 (บริษัท Agilent Technologies จำกัด)
14. Agilent 2100 Bioanalyzer (บริษัท Agilent Technologies จำกัด)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* spp.

1. Peptone (บริษัท Merck จำกัด)
2. Dey/Engley (D/E) Neutralizing Broth (บริษัท Difco จำกัด)
3. Half Fraser Broth (บริษัท Merck จำกัด)
4. Fraser Broth (บริษัท Merck จำกัด)
5. Oxford agar (บริษัท Merck จำกัด)
6. Ottaviani Agosti agar (OAA; บริษัท Merck จำกัด)
7. Tryptone Soy Agar (บริษัท Merck จำกัด)
8. Yeast Extract (บริษัท Merck จำกัด)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *Listeria* spp. โดยวิธีทางอณูชีววิทยา

1. Tryptic Soy Broth (บริษัท Merck จำกัด)
2. Yeast extract (บริษัท Merck จำกัด)
3. Lysozyme (บริษัท Amesco จำกัด)
4. *Taq* DNA polymerase (บริษัท Invitrogen จำกัด)
5. Deoxynucleoside triphosphate (บริษัท Fermentas จำกัด)
6. Primer (สั่งผลิตจากบริษัท 1st BASE จำกัด)
7. Ladder (บริษัท Agilent Technologies จำกัด)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษากระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

โรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกที่ศึกษานี้มีกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งหลายประเภท โดยงานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งประเภทหนึ่ง ซึ่งมีกำลังการผลิต 23,000 กิโลกรัมต่อวัน และในบริเวณของการผลิตมีการแยกกันอย่างเด็ดขาดของบริเวณการผลิตเนื้อไก่ดิบและเนื้อไก่ที่ปรุงสุกแล้ว กระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ประกอบด้วย การปรุงสุกเนื้อไก่โดยการนึ่งด้วยไอน้ำร้อน 100 °C จนอุณหภูมิใจกลางของชิ้นเนื้อไก่อยู่ที่ 80 °C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงทำเนื้อไก่ให้เย็นลง โดยขั้นตอนการทำให้เย็นลงขั้นแรกจะใช้ liquid nitrogen โดยเนื้อไก่บนสายพานจะผ่านเครื่อง liquid N₂ chiller ซึ่งทำให้เนื้อไก่มีอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 °C แล้วจึงทำให้เย็นลงอีกครั้งด้วยลมเย็น จนเนื้อไก่จะมีอุณหภูมิประมาณ 10 °C จากนั้นจึงหั่นเนื้อไก่ด้วยพนักงานหรือใช้เครื่องหั่น แช่เยือกแข็งชิ้นเนื้อไก่แบบ individual quick freezing (IQF) บรรจุเนื้อไก่แช่เยือกแข็งใส่ถุงพลาสติก ปิดผนึกปากถุงโดยเครื่องปิดผนึก ผ่านการตรวจจับโลหะด้วยเครื่องตรวจจับโลหะ อุณหภูมิห้องการผลิตประมาณ 10 °C และมีฉากสเตนเลสกันแยกบริเวณการผลิตในแต่ละกระบวนการผลิต

3.4.2 หาความชุกของการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต

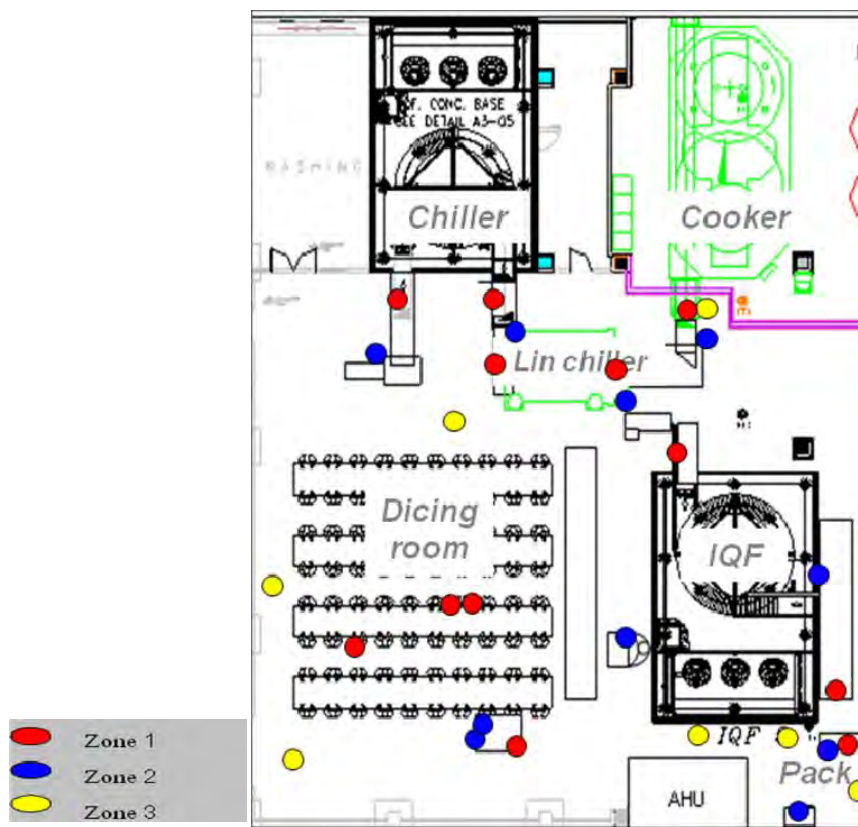
เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยเก็บผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ถูกบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกแล้ว และเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ระหว่างการผลิตในแต่ละขั้นตอน ได้แก่ (1) หลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน ณ จุดที่ออกจากเครื่องปรุงสุก (2) จุดที่ออกจากเครื่อง liquid N₂ chiller (3) จุดที่ออกจากเครื่อง chiller ด้วยลมเย็น (4) จุดที่ออกจากเครื่องหั่น หรือเนื้อไก่ที่หั่นเสร็จแล้วด้วยมือ (5) จุดที่ออกจากเครื่อง IQF การเก็บตัวอย่างจะใช้ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รองรับผลิตภัณฑ์จากสายพานหรือหยิบผลิตภัณฑ์โดยไม่ให้สัมผัสถุงมือหรือพื้นผิวของถุงด้านนอก เพื่อนำไปวิเคราะห์หากการมีอยู่ของ *Listeria* spp. ด้วยวิธี VIDAS[®] *Listeria* (LIS) (รายละเอียดในภาคผนวก ข้อ 1) และสำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบ *Listeria* spp. จะนำไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996 (รายละเอียดในภาคผนวก ข้อ 2) นำข้อมูลการพบมาหาความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ โดยเท่ากับอัตราส่วนระหว่างจำนวนตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ความชุกของ } Listeria \text{ spp. ในผลิตภัณฑ์} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบ } Listeria \text{ spp. ใน 10 สัปดาห์}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ของผลิตภัณฑ์
นั้นๆใน 10 สัปดาห์}}$$

การเก็บตัวอย่างจะเก็บทุกครั้งที่มีการผลิตโดยสุ่มตัวอย่างภายในช่วงเวลาการผลิต ซึ่งมีระยะเวลาการผลิต 20 ชั่วโมงต่อวัน แบ่งเป็นการผลิตช่วงกลางวันและช่วงกลางคืน โดยเก็บตัวอย่างทั้ง 2 ช่วงเวลา ในช่วงกลางวันเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มผลิตเวลา 7.00 น. ระหว่างผลิต 10.00 น. และ 16.00 น. ในช่วงกลางคืนเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มผลิตเวลา 19.00 น. ระหว่างผลิต 22.00 น. และ 04.00 น. เก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 100 ถึง 300 กรัม (ขึ้นกับขนาดของผลิตภัณฑ์) เป็นระยะเวลา 3 วันใน 1 สัปดาห์ ได้แก่ วันอังคาร วันพฤหัสบดี และวันศุกร์ ทำทั้งสิ้น 10 สัปดาห์

3.4.3 หาคความชุกของการปนเปื้อน *Listeria* spp. บริเวณพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตส่วนหลังการปรุงสุก

แบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมบริเวณการผลิตหลังกระบวนการให้ความร้อน ตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ เป็น 3 โซน (zone) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 และตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แผนผังการแบ่งโซนของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต

ตารางที่ 3.1 จุดเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

โซน	จุด swab
1 (พื้นผิวที่สัมผัสผลิตภัณฑ์)	สายพานออกจากเครื่องปรุงรส สายพานขาเข้าและขาออกที่จุดต่างๆ สายพานเครื่องหั่น ถาด/มีด/เขียง ถุงมือพนักงานที่จุดต่างๆ
2 (พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์ แต่อยู่ใกล้ผลิตภัณฑ์ และพื้นผิวที่ทำความสะอาดได้ยาก)	ผู้ควบคุมเครื่องจักรต่างๆ สายพานลำเลียงระหว่างจุด มอเตอร์/ปลั๊กไฟสายพาน ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller โต๊ะบรรจุผลิตภัณฑ์ โครง+ลูกกลิ้งสายพาน หน้าจอควบคุมเครื่องหั่น สายพานเครื่องตรวจจับโลหะและเครื่องปิดผนึก เครื่องชั่ง
3 (พื้นผิวที่ไม่สัมผัสผลิตภัณฑ์ และอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์)	พื้นบริเวณต่างๆ ผนังด้านนอกตู้แช่เยือกแข็ง ท่อระบายน้ำทิ้งของตู้แช่เยือกแข็ง

จากนั้น swab พื้นผิวของโซนที่บริเวณต่างๆ ที่คาดว่าจะพบ *Listeria* รวม 44 จุด เก็บตัวอย่าง 6 เวลาต่อวัน ในช่วงกลางวันเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มผลิตเวลา 7.00 น. ระหว่างผลิต 10.00 น. และ 16.00 น. ในช่วงกลางคืนเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มผลิตเวลา 19.00 น. ระหว่างผลิต 22.00 น. และ 04.00 น. เป็นระยะเวลา 3 วันใน 1 สัปดาห์ ได้แก่ วันอังคาร วันพฤหัสบดี และวันศุกร์ ทำทั้งสิ้น 10 สัปดาห์ โดย swab พื้นผิวด้วยก้าน swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ชุ่มด้วยสารละลาย Dey/Engley (D/E) Neutralizing Broth เข้มข้น 3.9% แล้วจึงเก็บรักษาก้าน swab ใน D/E Neutralizing Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พื้นที่ swab ขึ้นอยู่กับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่ swab โดย

swab พื้นที่ 100 ตารางเซนติเมตรสำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดมากกว่า 100 ตารางเซนติเมตร เช่น พื้นผิวสายพาน พื้น ผนัง เป็นต้น และ swab พื้นที่ผิวทั้งหมดสำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่ผิวทั้งหมดน้อยกว่า 100 ตารางเซนติเมตร เช่น ถู่มือพนักงาน ไบมีด ลูกกลิ้งสายพาน เป็นต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความชุกของ *Listeria* spp. โดยวิธี VIDAS® *Listeria* (LIS) และสำหรับตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. จะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996 นำข้อมูลการพบมาหาความชุกของ *Listeria* spp. ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมโดยเท่ากับอัตราส่วนระหว่างจำนวนตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์และจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ความชุกของ } Listeria \text{ spp. ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อม} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่พบ } Listeria \text{ spp. ที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ใน 10 สัปดาห์}}$$

3.4.4 หาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มในการจำแนก *Listeria* spp.

ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่าง *Listeria* โดยสกัดดีเอ็นเอของ *Listeria* เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา และการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอจากผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR Product) ดังนี้

การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* spp. แล้ว โดยถ่าย colony เดี่ยวของ *Listeria* spp. จากจานเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีส่วนผสมของ 0.6% Yeast extract แล้วบ่มที่ 37°C นาน 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงดูดสารละลายส่วนใสออก ล้างตะกอนเซลล์ด้วย Double distilled water (ddH₂O) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 150 ไมโครลิตร แล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย่อยสารละลายเซลล์ด้วยเอนไซม์ Lysozyme เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 40 นาที แล้วต้มสารละลายเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้สารละลายเย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000

รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (RBC) ทำการสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แล้ววัดความเข้มข้นของสารละลายโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นจึงเก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์

นำผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์จำนวน 1 ไมโครลิตร (จาก 1 ไพรมเมอร์) มาวิเคราะห์หาขนาดของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่โพลีเมอร์ ด้วยเครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer โดยใช้ชิป (chip) รุ่น Agilent DNA 7500

การหาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์แบบสุ่มในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย

3.4.4.1 คัดเลือกไพรมเมอร์ (Primer) ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่

ต้องการแบบสุ่ม

งานวิจัยนี้แบ่งขั้นตอนการคัดเลือกไพรมเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ ต้องการแบบสุ่มออกเป็น 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 เป็นการคัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* เพื่อใช้ทดสอบไพรมเมอร์ และขั้นตอนที่ 2 เป็นการคัดเลือกไพรมเมอร์ โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์แบบสุ่มของไพรมเมอร์กับตัวอย่าง *Listeria* ที่คัดเลือก ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ตอนที่ 1 คัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรมเมอร์

จำแนกตัวอย่าง *L. innocua* 15 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 10 ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. ในบริเวณการผลิตของโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุก ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยใช้ไพรมเมอร์ Universal Forward Sequencing (UFS; 5' TTATGTAAAACGACGCCAGT 3') ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ แล้วจึงคัดเลือกตัวอย่าง 10 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบไพรมเมอร์ โดยคัดเลือก *L. innocua* 5 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 3 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 2 ตัวอย่าง โดยในแต่ละชนิดของตัวอย่าง *Listeria* ที่คัดเลือกมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

ตอนที่ 2 คัดเลือกไพรมเมอร์

ใช้ไพรมเมอร์แต่ละตัวทั้ง 14 ตัวในตารางที่ 3.2 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์กับตัวอย่าง *Listeria* 10 ตัวอย่างที่คัดเลือกจากตอนที่ 1 แล้วคัดเลือกไพรมเมอร์ 4 ไพรมเมอร์ที่มีความสามารถจำแนกตัวอย่าง *Listeria* ทั้ง 10 ตัวอย่างได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากความหลากหลายของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์ของไพรมเมอร์แต่ละตัว

ตารางที่ 3.2 โพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ

โพรเมอร์ / ลำดับเบส	สารละลายของ ปฏิกิริยา PCR	สภาวะของ ปฏิกิริยา PCR	อ้างอิงจาก
<u>Universal forward sequencing primer</u> / 5' TTATGTAAAACGA CGGCCAGT 3'	1X PCR Buffer 1.5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTP 0.5 µM DNA Primer	94°C 3 min 94°C 45 sec 26°C 2 min 72°C 2 min	Macgowan et al. (1993)
<u>Sequencing primer for In21</u> / 5' GGGCGTTGT CGGTGTTCA TG 3'	0.1 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 5-10 µl of Genomic DNA	94°C 45 sec 36°C 1 min 72°C 2 min	
<u>Sequencing primer for the ampC gene</u> / 5' ACAGGT CC AACAAAAGCTGG 3'		72°C 5 min	
<u>UBC155</u> / 5' CTGGCGGCTG 3'	1X PCR Buffer 3 mM MgCl ₂	94°C 2 min 94°C 1 min	Farber & Addison (1994)
<u>UBC156</u> / 5' GCCTGGTTGC 3'	200 µM dNTP 1 µM DNA Primer	35°C 1 min 72°C 2 min 30 sec	
<u>UBC127</u> / 5' ATCTGGCAGC 3'	0.5 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 2 ng of Genomic DNA	72°C 5 min	
<u>CsM13</u> / 5' GAGGGTGGC GG TTCT 3'	1X PCR Buffer 3 mM MgCl ₂	94°C 1 min 94°C 30 sec	Chambel et al. (2007)
<u>inIAE</u> / 5' CAGGCAGCTA CAATTACACA 3'	0.2 mM dNTP 1 mM DNA Primer	35°C 1 min 72°C 1 min	
<u>PH</u> / 5' AAGGAGGTGAT CCAGCCGCA 3'	1 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 0.5 µl of Genomic DNA	72°C 4 min	

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ไพรมเมอร์ที่ใช้ทดสอบ

ไพรมเมอร์ / ลำดับเบส	สารละลายของ ปฏิกิริยา PCR	สภาวะของ ปฏิกิริยา PCR	อ้างอิง จาก
<u>PB1</u> / 5' GGAAGTCTA 3'	1X PCR Buffer	94°C 4 min	Byun
<u>PB4</u> / 5' AAGGATCAGC 3'	25 mM MgCl ₂ 10 µM dNTP 20 µM DNA Primer 2.0 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 2 ml of Genomic DNA	35°C 2 min 72°C 2 min 94°C 1 min 35°C 2 min 72°C 2 min 94°C 1 min 35°C 2 min 72°C 10 min	et al. (2001)
<u>HLWL74</u> / 5' ACGTATCTGC 3'	1X PCR Buffer 1.2 mM MgCl ₂	94°C 4 min 39°C 45 sec	Aguado et al. (2004)
<u>HLWL85</u> / 5' ACAACTGCTC 3'	100 AM dNTP 0.3 AM DNA Primer	72°C 1 min 94°C 15 sec	
<u>OMP-01</u> / 5' GTTGGTGGCT 3'	0.625 U <i>Taq</i> DNA Polymerase 7.5 µl of Genomic DNA	39°C 45 sec 72°C 1 min 94°C 15 sec 39°C,45 s; 72°C,10min	43 รอบ

3.4.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรมเมอร์ที่เลือก

แปรความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเป็น 8 ระดับได้แก่ 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วจึงทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรมเมอร์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.4.1 ตอนที่ 2 โดยระดับความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอครบทุกชิ้น และมองเห็นได้ชัดเจน

3.4.4.3 เปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในทางการค้า

คัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. innocua* 6 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 4 ตัวอย่าง และ *L. seeligeri* 2 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากตัวอย่าง *Listeria* spp. ที่พบในโรงงานผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ แล้วส่งจำแนกสายพันธุ์กับบริษัท DuPont™ จำกัด ซึ่งจำแนกโดยใช้วิธี Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA หรือ ribotyping จากนั้นนำตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่างนี้ก็จะนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.4.1 ตอนที่ 2 แล้วจึงเปรียบเทียบผลการจำแนก โดยพิจารณาจากความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่วิธีที่ใช้ในทางการค้าและวิธี RAPD (4 ไพรเมอร์) จำแนกได้

3.4.4.4 ทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

ใช้ตัวอย่าง *Listeria* 12 ตัวอย่างชุดเดียวกันกับข้อ 3.4.4.3 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้อีกครั้ง แล้วเปรียบเทียบผลระหว่างการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 1 ในข้อ 3.4.4.3 กับครั้งที่ 2 นี้ โดยผลการทำปฏิกิริยาทั้งสองครั้งจะต้องไม่มีความแตกต่างกันจึงจะถือว่าวิธี RAPD ด้วย 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการทำซ้ำได้

3.4.5 ประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อม

จำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่าง *Listeria* ที่ระบุชนิดแล้ว โดยใช้วิธี RAPD ด้วยไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้และใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา RAPD ทุกครั้งจะมีตัวอย่าง negative control ซึ่งใช้ ddH₂O แทนดีเอ็นเอต้นแบบของ *Listeria* เพื่อให้มั่นใจได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ต้องการจำแนกจริง และมีตัวอย่าง positive control ซึ่งใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. innocua* ที่แยกได้จากโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ เพื่อควบคุมความสม่ำเสมอและความสามารถในการทำซ้ำได้ของวิธี RAPD ในการประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อมใช้ Microsoft Excel 2007 for Windows ในการวิเคราะห์ผล

3.4.6 เสนอวิธีการสำหรับจัดการความเสี่ยง

เสนอวิธีการจัดการความเสี่ยงให้กับโรงงานผลิต โดยผู้จัดการความเสี่ยงของโรงงานผลิตจะเป็นผู้จัดการความเสี่ยง จากนั้นประเมินผลการนำวิธีทางอนุชีววิทยาามาประยุกต์ใช้ในการติดตามแหล่งของการปนเปื้อนและควบคุมการปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของการผลิต โดยเปรียบเทียบความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการนำวิธีทางอนุชีววิทยาามาประยุกต์ใช้

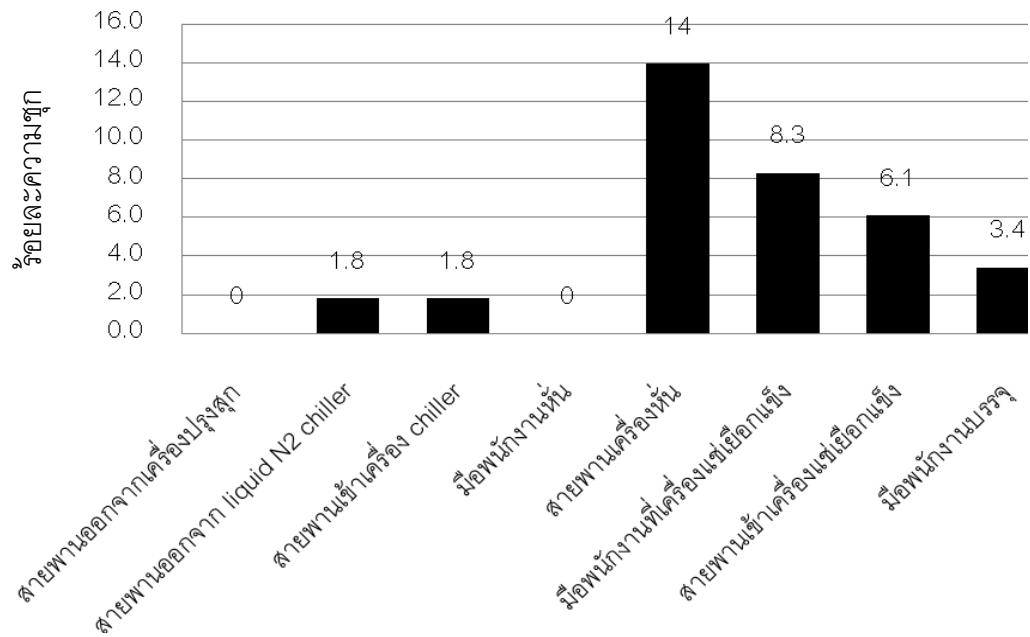
บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษารูปแบบการปนเปื้อน (Contamination profile) ของ *Listeria* spp. ก่อนการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

ในการศึกษารูปแบบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง ได้เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเนื้อไก่ปรุงสุกประเภทหนึ่งแช่เยือกแข็งและพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต โดยมีการแบ่งโซนของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมเป็น 3 โซน ดังรายละเอียดในข้อ 3.4.3 การเก็บตัวอย่างเริ่มต้นตั้งแต่เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ 2552 จากการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 278 ตัวอย่าง โดยเน้นการเก็บตัวอย่างที่พื้นผิวของโซน 1 (226 ตัวอย่าง) ซึ่งเป็นพื้นผิวที่มีโอกาสสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ พบว่าพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด คือโซน 3 (ร้อยละ 30.4) ซึ่งได้แก่ พื้น ท่อระบายน้ำ ขอบปูนของเครื่อง IQF และร่องเท้าบู๊ทของพนักงาน ส่วนโซนที่ 1 พบความชุกของการปนเปื้อนอยู่ที่ร้อยละ 8.8 และโซนที่ 2 ไม่พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. เลย

สำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมของโซน 1 ได้เก็บตัวอย่างพื้นผิวสายพานออกจากเครื่องปรุงสุก สายพานออกจากเครื่อง liquid N₂ chiller, สายพานเข้าเครื่อง chiller, มือพนักงานหั่น สายพานเครื่องหั่น มือพนักงานเกลี่ยสินค้าที่เครื่องแช่เยือกแข็ง, สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง และมือพนักงานบรรจุ พบว่าสายพานเครื่องหั่นมีความชุกของ *Listeria* มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 14.0 ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และจากตารางที่ 4.1 ซึ่งแสดงความชุกของ *Listeria* spp. ของพื้นผิวที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆของการผลิต ยังพบว่าการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ที่สายพานเครื่องหั่นอยู่เกือบตลอดระยะเวลาการผลิตด้วย โดยในงานวิจัยของ Lundén, Autio และ Korkeala (2002) ซึ่งศึกษาการถ่ายโอนของการปนเปื้อนข้ามเนื่องจากเครื่องหั่นของ *L. monocytogenes* ที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ระหว่างโรงงานผลิต และงานวิจัยของ Autio และคณะ (1999) ศึกษาแหล่งของการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในโรงงานผลิตปลาเรนโบว์เทราท์ (Rainbow trout) รวมวันแบบเย็นโดยการจำแนกด้วยวิธี Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) ก็พบรูปแบบการปนเปื้อนในลักษณะเดียวกัน โดยพบว่าเครื่องสไลด์เครื่องหั่น และเครื่องจักรบรรจุเป็นแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 4.1 ความชุกของ *Listeria* spp. ณ บริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ก่อนการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

ตารางที่ 4.1 ความชุกของ *Listeria* spp. ณ บริเวณที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆของการผลิต

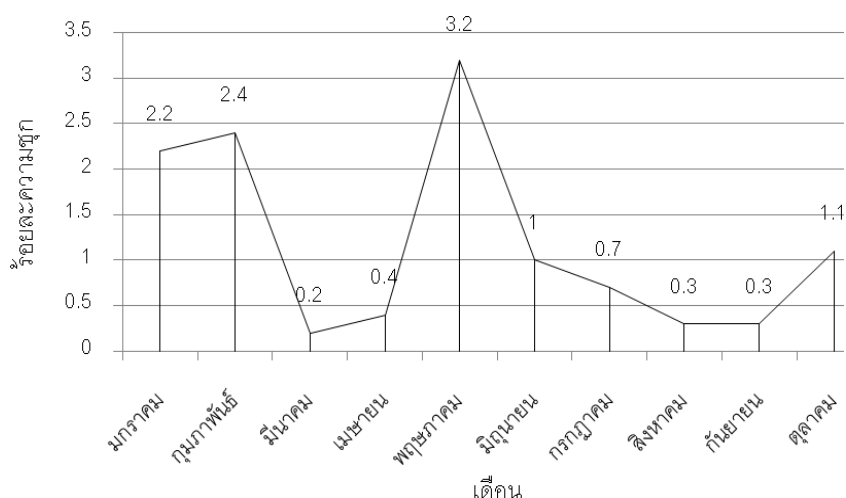
จุด swab	ร้อยละความชุกของ <i>Listeria</i> spp. ที่เวลา (นาฬิกา) ต่างๆ									
	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	
สายพานออกจากเครื่องปรุงรสสุก										
สายพานออกจาก liq. N ₂ chiller			33.3							
สายพานเข้า chiller										
มือพนักงานหัน										
สายพานเครื่องหัน		33.3	66.7	100		33.3	66.7	33.3	100	
มือพนักงานที่เครื่องแช่เยือกแข็ง			66.7	50						
สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง								33.3		
มือพนักงานบรรจุ				50						

ดังนั้นจากการศึกษารูปแบบการปนเปื้อน พบว่าเครื่องหันและสายพานของเครื่องหันอาจเป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ *Listeria* ในผลิตภัณฑ์ จึงมีการจัดการความเสี่ยง เพื่อแก้ไขปัญหาการพบ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ โดยได้มีการแยกชิ้นส่วนของตัวเครื่องหันก่อนแล้วจึงทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ เปลี่ยนสายพานของเครื่องหันโดยแบบเดิมมีพื้นผิวของสายพานแบบร่องฟันปลาทำให้ล้างทำความสะอาดยากเนื่องจากมีซอกมุมลึก จึงเปลี่ยนมาใช้พื้นผิวแบบจุดนูนแทน มีการเปลี่ยนชนิดและเพิ่มความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อโดยเดิมใช้สารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compound เข้มข้น 0.2% ได้เปลี่ยนมาใช้สารฆ่าเชื้อในกลุ่ม peracetic acid เข้มข้น 3.0% (pH 4.02) สูดทำยาล้างใช้ไอน้ำร้อนพ่นหลังทำความสะอาดแล้วหรือก่อนการใช้งาน สำหรับการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในโซน 3 ถึงแม้ว่าพื้นผิวสิ่งแวดล้อมของโซน 3 จะอยู่ไกลจากผลิตภัณฑ์ แต่ก็มีโอกาสการถ่ายโอน (transfer) ของเชื้อข้ามโซนแล้วปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ได้ ดังนั้นจึงได้มีการจัดการกับพื้นผิวในโซนที่ 3 ซึ่งส่วนใหญ่พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ที่พื้น ท่อระบายน้ำ และขอบปูนของเครื่องแช่เยือกแข็ง ได้มีการใช้ Bio Enzyme ฆ่าท่อระบายน้ำ ใช้ถุงตาข่ายดักเศษเนื้อไก่ที่ออกมาจากท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง เพื่อไม่ให้เศษเนื้อกระจายเลอะเทอะอยู่บนพื้น ฆ่าเชื้อในท่อระบายน้ำด้วยสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม peracetic acid เข้มข้น 3.0% สูดทำยาล้างใช้ไอน้ำร้อนพ่นฆ่าเชื้อที่พื้นและขอบปูนของเครื่องแช่เยือกแข็ง ซึ่งหลังจากการจัดการแล้วมีการเก็บตัวอย่างพื้นผิวสิ่งแวดล้อมตามโซนต่างๆเป็นระยะ ดังผลแสดงในตารางที่ 4.2 พบความชุกของ *Listeria* spp. ลดลงทุกครั้ง โดยก่อนมีการจัดการพบพื้นผิวสิ่งแวดล้อมของโซน 1 มีความชุกของ *Listeria* spp. อยู่ที่ร้อยละ 31.2 หลังสิ้นสุดการจัดการครั้งที่ 4 แล้วและเก็บตัวอย่างพบความชุกลดลงเหลือเพียงร้อยละ 2.2 เท่านั้น และไม่พบการปนเปื้อนเลยในเดือนถัดมา และสำหรับพื้นผิวสิ่งแวดล้อมที่โซน 3 มีความชุกอยู่ที่ร้อยละ 46.2 หลังสิ้นสุดการจัดการครั้งที่ 4 แล้วและเก็บตัวอย่าง ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างปนเปื้อน *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมเลย และพบการปนเปื้อนของเชื้ออีกในเดือนถัดมา โดยมีความชุกของ *Listeria* spp. อยู่ที่ร้อยละ 5.9

ตารางที่ 4.2 ความชุกของ *Listeria* spp. หลังการจัดการความเสี่ยงในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552

ไซน	ร้อยละความชุกของ <i>Listeria</i> spp.					เดือนหลัง การจัดการ
	ก่อนจัดการ	การจัดการ ครั้งที่ 1	การจัดการ ครั้งที่ 2	การจัดการ ครั้งที่ 3	การจัดการ ครั้งที่ 4	
	เก็บตัวอย่าง ก่อนจัดการ	เก็บตัวอย่าง ครั้งที่ 1	เก็บตัวอย่าง ครั้งที่ 2	เก็บตัวอย่าง ครั้งที่ 3	เก็บตัวอย่าง ครั้งที่ 4	
1	31.2	7.6	0.0	0.0	2.2	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	3.8	0.0
3	46.2	9.1	10.0	7.7	0.0	5.9

แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงพบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายภายหลังจากการจัดการในเดือนกุมภาพันธ์แล้ว ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายลดลงจากร้อยละ 2.4 ในเดือนกุมภาพันธ์ เหลือเพียงร้อยละ 0.2 ในเดือนมีนาคม จากนั้นความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายกลับเพิ่มขึ้นในเดือนถัดมา ซึ่งพบค่าสูงที่สุดในเดือนพฤษภาคม (ร้อยละความชุก 3.2) ต่อมาความชุกลดลงในเดือนมิถุนายนและยังคงพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อยู่ถึงเดือนตุลาคม แสดงให้เห็นว่าการจัดการที่ผ่านมายังไม่สามารถกำจัดแหล่งของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ที่แท้จริง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำวิธีทางอณูชีววิทยาวิเคราะห์ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์เพื่อติดตามหาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนต่อไป



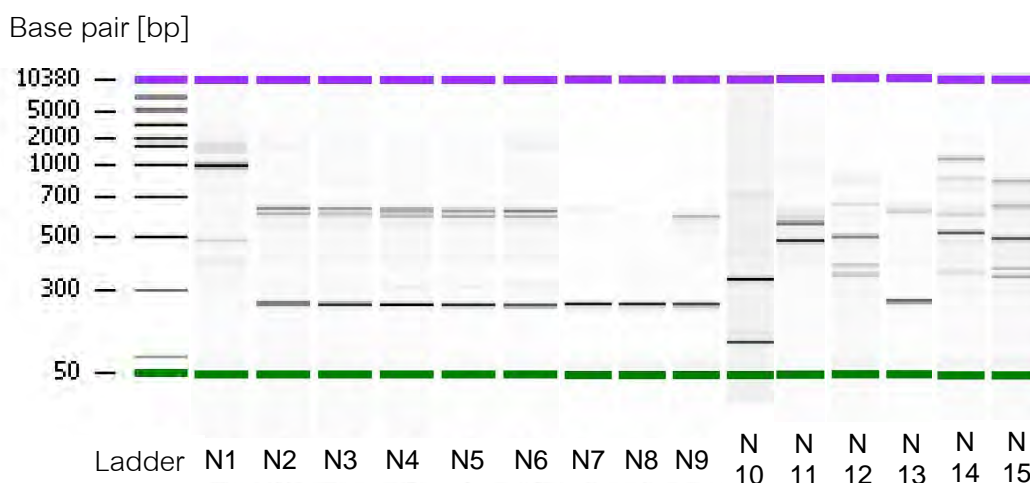
ภาพที่ 4.2 ความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์ ตั้งแต่เดือนมค. – ตค. 2552

ก่อนการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม

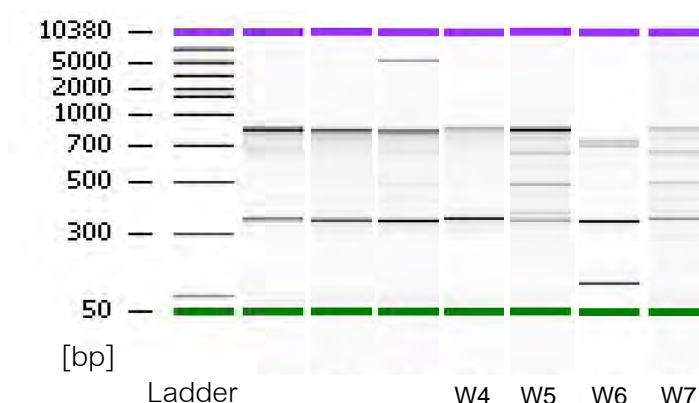
4.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการแบบสุ่ม

ในงานวิจัยนี้แบ่งการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมออกเป็น 2 ขั้นตอน คือการคัดเลือกตัวอย่าง *Listeria* เพื่อใช้ในการทดสอบไพรเมอร์ และการคัดเลือกไพรเมอร์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่สร้างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันสามารถแปลความหมายได้สองลักษณะ คือตัวอย่าง *Listeria* spp. เหล่านั้นมีสายพันธุ์เดียวกัน หรือไพรเมอร์ Universal Forward Sequencing (UFS) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มกับตัวอย่าง *Listeria* ที่ใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของตัวอย่าง *Listeria* เหล่านั้นได้ ดังนั้นในการเลือกตัวอย่างเชื้อที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์จึงต้องเลือกตัวอย่างเชื้อที่มีความแตกต่างกันอย่างแน่นอน จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ UFS กับตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* จำนวน 15 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอในข้อ 3.4.4 พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 4.3 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. innocua* จำนวน 5 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง N3, N10, N12, N14 และ N15 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



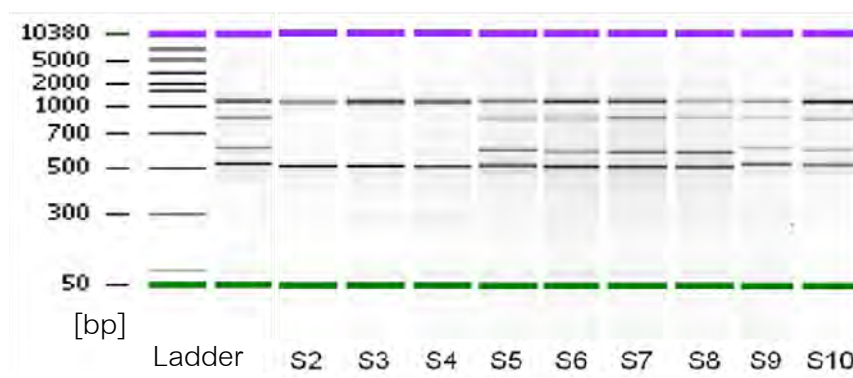
ภาพที่ 4.3 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. innocua* 15 ตัวอย่าง
สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

ในกรณีของ *L. welshimeri* จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. welshimeri* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังผลแสดงในภาพที่ 4.4 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. welshimeri* จำนวน 3 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง W3, W5 และ W6 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



ภาพที่ 4.4 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. welshimeri* 7 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

สำหรับ *L. seeligeri* จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. seeligeri* 10 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. seeligeri* ที่มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังผลแสดงในภาพที่ 4.5 จึงทำการเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอจาก *L. seeligeri* จำนวน 2 ตัวอย่างจากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่าง S1 และ S2 มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ต่อไป



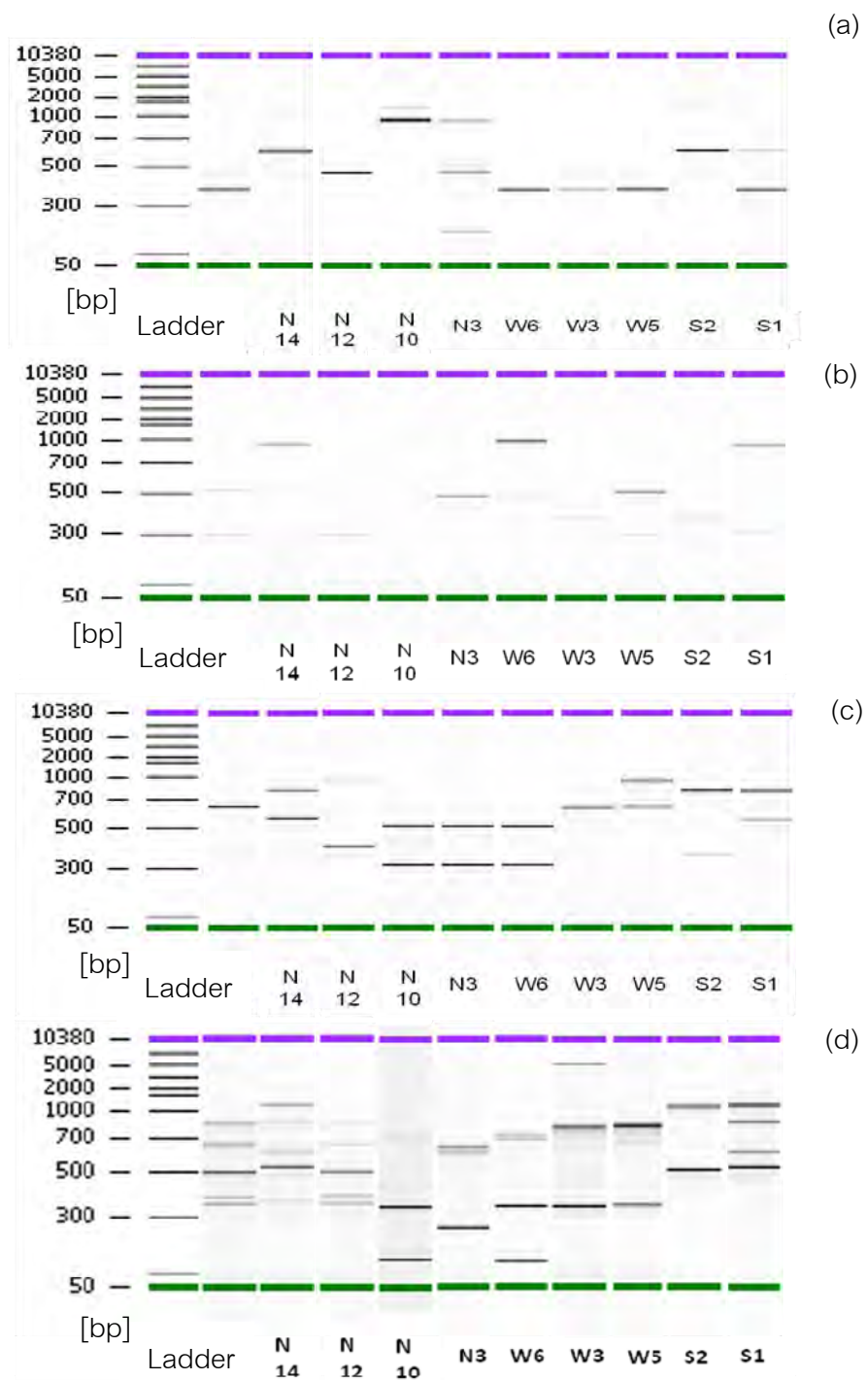
ภาพที่ 4.5 ภาพ Gel electrophoresis ของตัวอย่าง *L. seeligeri* 10 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์

สำหรับการคัดเลือกไพรเมอร์ ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญกับ *L. monocytogenes* เป็นหลัก เนื่องจาก *L. monocytogenes* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ ดังนั้นงานวิจัยส่วนใหญ่จึงรายงานเฉพาะไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนก *L. monocytogenes* แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจาก *L. monocytogenes* ด้วย จึงจำเป็นต้องคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนก *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* ซึ่งเป็น *Listeria* นอกจากชนิด *monocytogenes* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ หลังจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *Listeria* 10 ตัวอย่างที่คัดเลือกไว้ ซึ่งเป็น *L. innocua* 5 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง N3, N10, N12, N14 และ N15) *L. welshimeri* 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง W3, W5 และ W6) และ *L. seeligeri* 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง S1 และ S2) โดยทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มกับไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถจำแนก *L. monocytogenes* ได้ดี รวมทั้งหมด 14 ไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 3.2 ในข้อ 3.4.4.1 ซึ่ง Kerr และคณะ (1995) แนะนำว่าการจำแนก *L. monocytogenes* โดยใช้วิธี RAPD วิธีเดียว ควรใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 3 ไพรเมอร์ในการจำแนก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือก 4 ไพรเมอร์ที่มีความสามารถในการจำแนก *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* ได้ดีที่สุด ได้แก่ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มจากทั้ง 14 ไพรเมอร์แสดงดังในตารางที่ 4.3 โดยไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. innocua* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ OMP-01 โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. innocua* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 5 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 5 รูปแบบ สำหรับไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. welshimeri* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ HLWL 74 และ HLWL 85 โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. welshimeri* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 3 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. seeligeri* ได้ดีคือ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS โดยจำแนกความแตกต่างของ *L. seeligeri* ที่ใช้ทดสอบได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง พิจารณาจากการได้รูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ ซึ่งผลการจำแนกตัวอย่าง *Listeria* ที่ใช้ทดสอบทั้ง 10 ตัวอย่างของไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS แสดงดังในภาพที่ 4.6 และในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* เพื่อติดตามหาแหล่งการปนเปื้อนในงานวิจัยนี้ ใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มตามแหล่งอ้างอิงของแต่ละไพรเมอร์ที่คัดเลือกดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 4.3 จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์ของตัวอย่าง *Listeria* ที่ใช้ทดสอบไพรเมอร์ต่างๆ

ไพรเมอร์	จำนวนรูปแบบของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์		
	จาก <i>L. innocua</i>	จาก <i>L. welshimeri</i>	จาก <i>L. seeligeri</i>
	5 ตัวอย่าง	3 ตัวอย่าง	2 ตัวอย่าง
OMP-01	5	2	2
HLWL 74	4	3	2
HLWL 85	4	3	2
UFS	4	2	2
Amp C	3	2	1
UBC 127	3	2	1
UBC 155	3	2	1
UBC 156	3	2	1
Tn 21	x ^a	x	x
PB 1	x	x	x
PB 4	x	x	x
CsM 13	x	x	x
inl AF	x	x	x
PH	x	x	x

^a ไม่มีผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอร์เกิดขึ้น พิจารณาจากการไม่มีแถบดีเอ็นเอแสดงให้เห็น

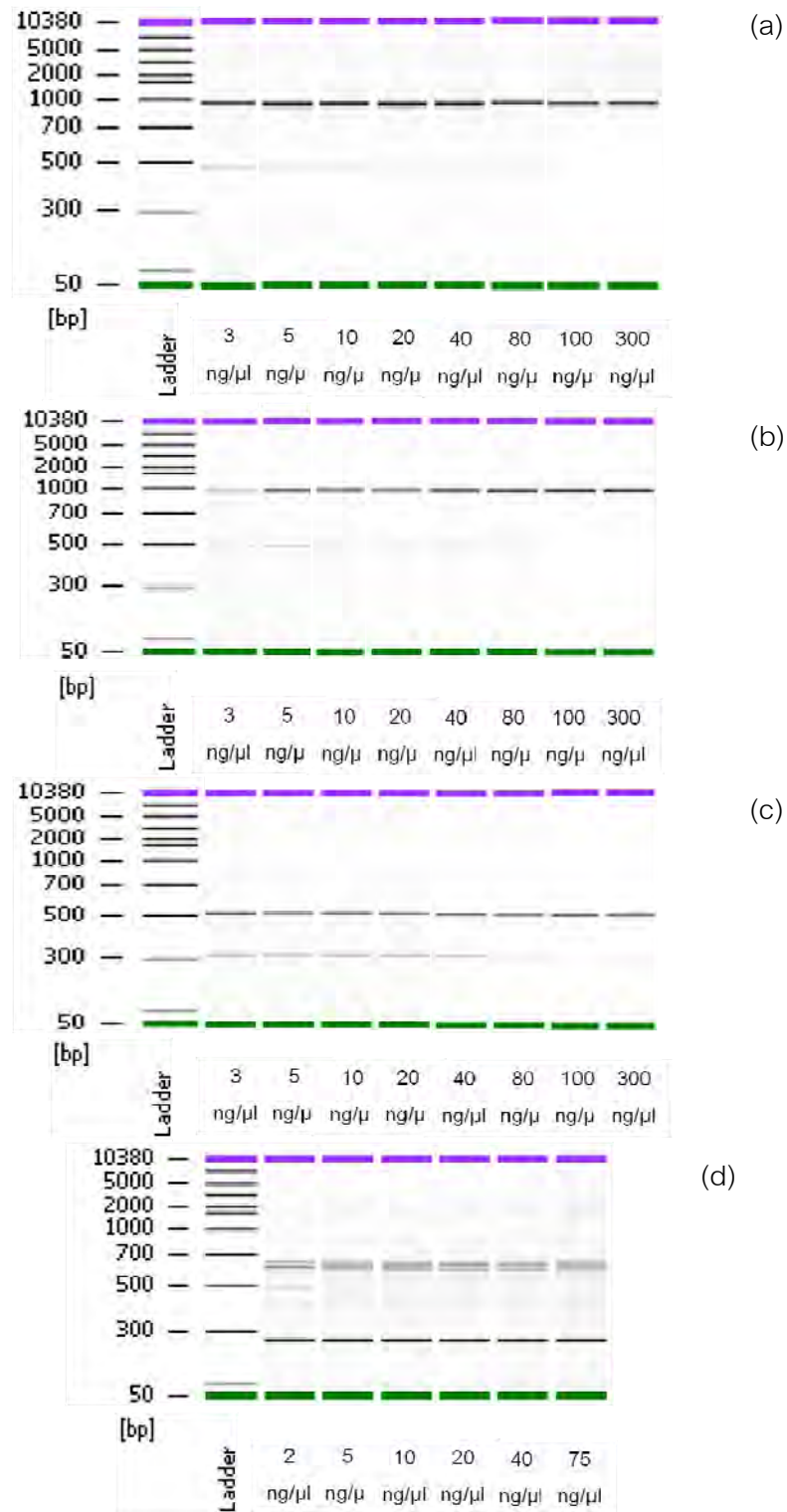


ภาพที่ 4.6 ภาพ Gel electrophoresis ของ *Listeria* ชนิดต่างๆ 10 ตัวอย่าง จากไพรมอร์

(a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS

4.2.2 การศึกษาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่เลือก

เพื่อให้ได้ผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอครบทุกชิ้น และมองเห็นได้ชัดเจน จึงศึกษาหาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมกับไพรเมอร์แต่ละตัวที่คัดเลือกไว้ โดยการแปรความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของตัวอย่าง *L. innocua* N14 เป็น 8 ระดับ ได้แก่ 3, 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มกับไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ ซึ่งได้แก่ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS พบว่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีอิทธิพลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในช่วงความเข้มข้น 3 ถึง 80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรยังไม่มีผลทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสจากทั้ง 4 ไพรเมอร์เปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบถึง 100 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสเปลี่ยนแปลง โดยมีแถบดีเอ็นเอหายไปหนึ่งแถบ ดังผลแสดงในภาพที่ 4.7 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่พบปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิตจึงใช้ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของทั้ง 4 ไพรเมอร์ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจน และสะดวกในการใช้งาน แต่อย่างไรก็ตาม Niederhauser และคณะ (1994) ศึกษาการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของ *L. monocytogenes* โดยใช้ 11 ไพรเมอร์ และประยุกต์ใช้ผลการจำแนกของ *L. monocytogenes* ในการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร ได้รายงานว่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีผลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสไม่มากนัก โดยความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์จำนวน 10^5 , 10^6 และ 10^7 เซลล์ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน มีเพียงความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่แปรผันไปเล็กน้อยเท่านั้น



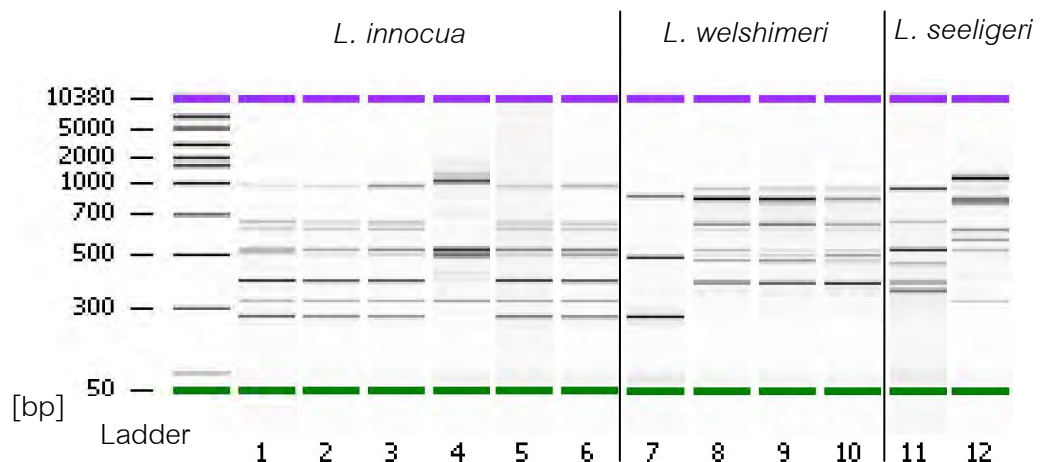
ภาพที่ 4.7 ภาพ Gel electrophoresis ที่แต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ *L. innocua* จากไพรเมอร์ (a) OMP-01, (b) HLWL74, (c) HLWL85 และ (d) UFS

4.2.3 การเปรียบเทียบวิธี RAPD กับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping)

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี RAPD กับวิธี ribotyping โดยการนำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่าง *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* โดยใช้ 4 ไพรมเมอร์ที่คัดเลือกไว้แล้วเปรียบเทียบผลการจำแนกจากวิธี RAPD กับผลการจำแนกจากวิธี ribotyping จากบริษัท DuPont™ จำกัด พบว่าวิธี RAPD มีความสามารถเหนือกว่าวิธี ribotyping ในการจำแนก *L. welshimeri* เนื่องจากวิธี ribotyping ไม่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่าง *L. welshimeri* 4 ตัวอย่างได้ (ตัวอย่างที่ 7 ถึง 10) โดยให้รหัสเป็น *L. welshimeri* 1079 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แต่วิธี RAPD โดยใช้ 4 ไพรมเมอร์ที่คัดเลือกไว้สามารถแยกความแตกต่างของ *L. welshimeri* ตัวอย่างที่ 7 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และทั้งสองวิธีมีความสามารถเท่าเทียมกันในการจำแนก *L. innocua* (ตัวอย่างที่ 1 ถึง 6) และ *L. seeligeri* (ตัวอย่างที่ 11 ถึง 12) โดยวิธี ribotyping และวิธี RAPD สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ *L. innocua* ตัวอย่างที่ 4 (รหัส DuPont™ - *L. innocua* 1006) และ *L. seeligeri* ตัวอย่างที่ 12 (รหัส DuPont™ - *L. seeligeri* 1063) ได้เหมือนกัน

ตารางที่ 4.4 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* ด้วยวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping)

ตัวอย่างที่	รหัสจาก DuPont™
1	<i>L. innocua</i> 1010
2	<i>L. innocua</i> 1010
3	<i>L. innocua</i> 1010
4	<i>L. innocua</i> 1006
5	<i>L. innocua</i> 1010
6	<i>L. innocua</i> 1010
7	<i>L. welshimeri</i> 1079
8	<i>L. welshimeri</i> 1079
9	<i>L. welshimeri</i> 1079
10	<i>L. welshimeri</i> 1079
11	<i>L. seeligeri</i> 1065
12	<i>L. seeligeri</i> 1065/1063



ภาพที่ 4.8 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Listeria* ด้วยวิธี RAPD (4 ไพรเมอร์)
เพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping)

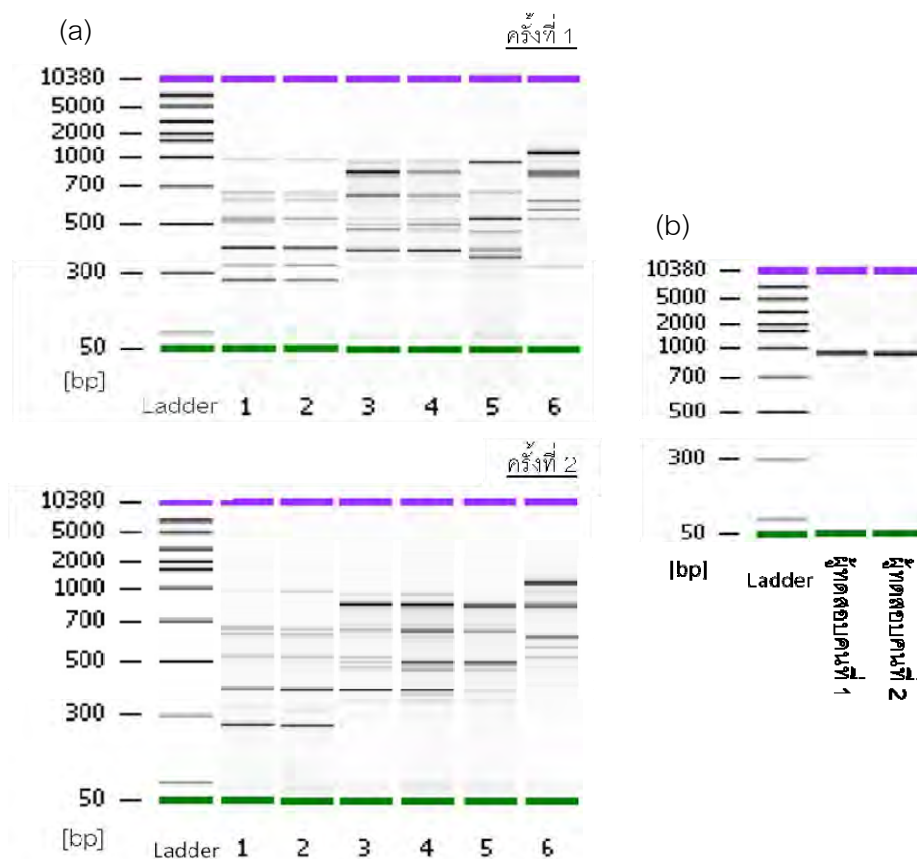
เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการจำแนกของวิธี RAPD กับวิธี ribotyping แล้ว พบว่าการจำแนกด้วยวิธี RAPD มีโอกาสที่จะพบความแตกต่างของเชื้อแต่ละตัวมากกว่าวิธี ribotyping เนื่องจากวิธี RAPD จำแนกความแตกต่างของเชื้อโดยการจับกับแบบสุ่มของไพรเมอร์กับ DNA ทั้งจีโนม (genome) ขณะที่วิธี ribotyping เป็นการจำแนกโดยการจับกับของไพรเมอร์กับ 16s rRNA ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) การเกิดวิวัฒนาการหรือการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของเชื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณนี้ช้าที่สุด (Case et al., 2007) ทำให้มีโอกาสน้อยที่จะพบความแตกต่างของเชื้อแต่ละตัวโดยการพิจารณาจากบริเวณอนุรักษ์นี้ ซึ่ง Kerouanton และคณะ (1998) ศึกษาการจำแนก *L. monocytogenes* ด้วยวิธี RAPD เปรียบเทียบกับวิธี ribotyping ก็พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 35 สายพันธุ์ วิธี RAPD วิเคราะห์ได้ 13 รูปแบบโดยใช้เพียง 1 ไพรเมอร์ (5' ACGTATCTGC 3') ส่วนวิธี ribotyping วิเคราะห์ได้เพียง 10 รูปแบบ และในงานวิจัยเดียวกันนี้ยังเปรียบเทียบการจำแนก *L. monocytogenes* ด้วยวิธี RAPD กับวิธีทางอณูชีววิทยาอื่นๆ ได้แก่ PFGE, electrophoretic typing of esterases (zymotyping) และ serotyping พบว่าวิธี PFGE จำแนก *L. monocytogenes* ได้ 12 รูปแบบ วิธี zymotyping จำแนกได้ 8 รูปแบบ และวิธี serotyping จำแนกได้ 5 รูปแบบเท่านั้น ส่วน Boerlin และคณะ (1995) ได้ศึกษาการจำแนก *L. monocytogenes* ด้วยวิธี RAPD เปรียบเทียบกับวิธีทางอณูชีววิทยาอื่นๆ อีก 5 วิธี พบว่าจากการจำแนก *L. monocytogenes* ทั้งหมด 100 สายพันธุ์ วิธี RAPD โดยใช้ 3 ไพรเมอร์ มีความสามารถในการจำแนก *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ วิธี phage typing, restriction enzyme analysis (REA), multilocus enzyme electrophoresis (MEE), ribotyping และ serotyping ตามลำดับ

4.2.4 การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของตัวอย่าง *Listeria* ชุดเดียวกัน 2 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.9a ซึ่งพบว่าผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสจากการทำปฏิกิริยาในครั้งที่ 1 และ 2 ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มของผู้ทดสอบ 2 คน โดยเป็นการทำปฏิกิริยาของตัวอย่าง *L. innocua* ด้วยไพรเมอร์ OMP-01 พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสของผู้ทดสอบทั้งสองคนไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.9b) ดังนั้นวิธี RAPD ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงมีความสามารถในการทำซ้ำได้ แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบมีผลต่อความสามารถในการทำซ้ำของวิธี RAPD เนื่องจากเริ่มแรกผู้วิจัยใช้เพียงวิธีการต้มสารละลายเซลล์ นาน 10 นาที พบว่าไม่สามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการต้มสารละลายเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง รวมทั้งสิ่งเจือปน (impurities) ที่อาจอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการต้มสารละลายเซลล์ ทำให้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแต่ละครั้งถึงแม้จะใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบของ *Listeria* ชุดเดียวกัน แต่ก็ไม่สามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้ ดังนั้นต่อมาจึงเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดอุปกรณ์ (DNA extraction kit) รวมทั้งเพิ่มขั้นตอนการย่อยเซลล์ด้วยเอนไซม์ lysozyme เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 40 นาที และการต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ทำให้ตัวเซลล์แตกมากขึ้น เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ รวมทั้งควบคุมความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ จึงพบว่าสามารถทำซ้ำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้

จากงานวิจัยของ Fannesbech Vogel และคณะ (2001) ซึ่งศึกษาความหลากหลายของ *L. monocytogenes* ในปลาแซลมอนรมควันเย็น (cold-smoked salmon) และการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยใช้วิธี RAPD ด้วย 4 ไพรเมอร์ รายงานว่าคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบมีความสำคัญอย่างมากต่อความสามารถในการทำซ้ำของวิธี RAPD โดยการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบด้วยการต้มและการใช้สกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform) ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งความเข้มและจำนวนของแถบดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C นาน 9 เดือน และสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมใหม่มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม พบว่าอายุการเก็บรักษาของดีเอ็นเอต้นแบบไม่มีผลถึงรูปแบบและจำนวนของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่เกิดขึ้น ในงานวิจัยของ Boerlin และคณะ (1995) พบว่าการใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา RAPD ที่เหมือนกัน แต่เปลี่ยนเครื่อง thermocycler ที่ใช้ในการเปลี่ยนรอบอุณหภูมิของสภาวะในการทำ

ปฏิกริยามีผลต่อความสามารถในการทำซ้ำของวิธี RAPD ดังนั้นในแต่ละห้องปฏิบัติการจึงควรปรับสภาพที่เหมาะสมของปฏิกริยาสำหรับห้องปฏิบัติการนั่นเอง เพื่อให้วิธี RAPD ที่ใช้มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ได้ผลขัดแย้งกันเกี่ยวกับวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบและการใช้เครื่อง thermocycler โดยในงานวิจัยของ Lin และคณะ (1996) รายงานว่าวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกันโดยใช้การต้มและการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม จากการเปรียบเทียบผลการทำปฏิกริยา 2 ครั้ง พบว่าวิธี RAPD ยังคงมีความสามารถในการทำซ้ำได้ดีในตัวอย่าง *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* และ *Salmonella enteritidis* รวมทั้งการใช้เครื่อง thermocycler คนละเครื่องในการทำปฏิกริยา โดยเครื่องหนึ่งผลิตจากบริษัท Perkin-Elmer และอีกเครื่องผลิตจากบริษัท MJ Research พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสยังคงเหมือนเดิม



ภาพที่ 4.9 ภาพ Gel electrophoresis ของ (a) *Listeria* spp. จาก 4 ไพรเมอร์เปรียบเทียบกันสองครั้ง (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2 เป็น *L. innocua*; 3, 4 เป็น *L. welshimeri*; 5, 6 เป็น *L.*

seeligeri) และ (b) *L. innocua* จากไพรเมอร์ OMP-01 โดยผู้ทดสอบ 2 คน

4.3 การจำแนกการปนเปื้อนของ *Listeria* ระดับชนิด (species) ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม

เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์เบื้องต้นของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในกระบวนการผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่ศึกษานี้ จึงได้สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมแล้วจำแนก *Listeria* ในระดับชนิด (species) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี VIDAS[®] *Listeria* (LIS) (รายละเอียดในภาคผนวก ข้อ 1) และสำหรับตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. จะนำไปวิเคราะห์หาชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996 (รายละเอียดในภาคผนวก ข้อ 2) ซึ่งตลอดระยะเวลาการสุ่มตัวอย่างตั้งแต่กลางเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงมกราคม 2553 พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตทั้งหมด 5 ขั้นตอน ได้แก่ หลังการปรุงสุก หลังการทำให้เย็นด้วยเครื่อง liquid N₂ chiller หลังการทำให้เย็นด้วยลมเย็นโดยเครื่อง chiller หลังการหั่นทั้งการหั่นด้วยมือและเครื่องหั่น หลังการแช่เยือกแข็ง รวมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนๆละ 865 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 5 ขั้นตอนได้ 4,325 ตัวอย่าง ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. อยู่เลย แต่เมื่อผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการผลิตต่อไป จนผ่านการแช่เยือกแข็งและบรรจุถุง พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และเมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. ไปวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* พบว่าเป็น *L. innocua* 12 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 1 ตัวอย่างและ *L. seeligeri* 1 ตัวอย่าง ซึ่งคิดความชุกของ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้เท่ากับร้อยละ 1.6 โดยการพบ *Listeria* spp. ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่กลับไม่พบในผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิตนั้น ไม่ได้หมายความว่าไม่มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. อยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต แต่เป็นผลเนื่องมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างที่ไม่พบตัวอย่างที่ปนเปื้อนเท่านั้น

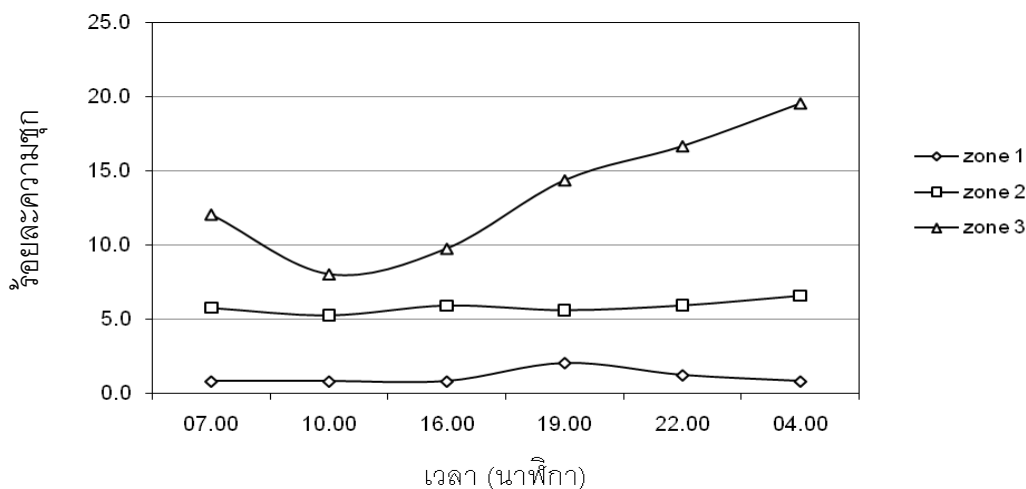
ในการสุ่มเก็บตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตในหนึ่งวัน ทั้งหมด 6 เวลาของการผลิตทั้งในรอบการผลิตช่วงกลางวันและรอบการผลิตช่วงกลางคืน พบว่าการเก็บตัวอย่างในรอบการผลิตช่วงกลางวันกับช่วงกลางคืนไม่มีผลต่อการพบ *Listeria* spp. พิจารณาจากความชุกของ *Listeria* ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* และ *L. monocytogenes* ที่พบที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในรอบการผลิตกลางวันมีค่าใกล้เคียงกับความชุกในรอบกลางคืน ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5 ซึ่งอาจเนื่องจากโรงงานผลิตไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่ศึกษาในงานวิจัยนี้มีการควบคุมทั้งด้านการผลิตและสุขาภิบาล (sanitation) ที่สม่ำเสมอทั้งในรอบกลางวันและกลางคืน ขณะที่ Whyte และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาผลของเวลาในการสุ่มเก็บตัวอย่างต่อระดับของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงงานผลิตเนื้อไก่ พบว่ารอบการผลิตกลางคืนมีระดับของ

เชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria* spp. ต่ำกว่ารอบการผลิตในช่วงกลางวัน ยกเว้น *L. monocytogenes* ที่พบในรอบการผลิตกลางวันมากกว่า

ตารางที่ 4.5 ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ แบ่งตามรอบการผลิต

ชนิดของ <i>Listeria</i>	ร้อยละความชุกของ <i>Listeria</i>	
	รอบการผลิตช่วงกลางวัน	รอบการผลิตช่วงกลางคืน
<i>L. innocua</i>	4.32	4.27
<i>L. welshimeri</i>	0.58	0.6
<i>L. seeligeri</i>	0.13	0.44
<i>L. monocytogenes</i>	0.05	0.05

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเวลาของการผลิตในแต่ละรอบการผลิตมีผลต่อการพบ *Listeria* จากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าตั้งแต่เวลาเริ่มต้นของการผลิตของรอบการผลิตช่วงกลางวันที่ 7:00 นาฬิกา และรอบการผลิตช่วงกลางคืนที่ 19:00 นาฬิกาพบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้ง 3 โซน แสดงว่าการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อหลังการปฏิบัติงานเมื่อสิ้นสุดการผลิตไม่สามารถกำจัด *Listeria* spp. บนพื้นผิวได้หมด โดยความชุกของ *Listeria* spp. ของโซน 3 ตั้งแต่เวลา 16:00 ถึง 4:00 นาฬิกาเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาของการผลิตเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ในช่วงเวลานี้ถูกละเลยในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ ทำให้มีการเจริญเติบโตของ *Listeria* spp. หรือมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นระหว่างโซนในระหว่างการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของความชุกของ *Listeria* spp. ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ในรอบการผลิตช่วงกลางวันเวลา 7:00 ถึง 10:00 นาฬิกาอาจเป็นเพราะว่าพื้นผิวเหล่านั้นมีความชื้นลดลงเมื่อการผลิตดำเนินไป ทำให้พบเชื้อน้อยลง สำหรับลักษณะการพบเชื้อในโซน 1 และ 2 แสดงว่ามีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนทั้งสองนี้อย่างสม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามการทำความสะอาดระหว่างเวลาพักและการทำความสะอาดเมื่อสิ้นสุดการผลิตในแต่ละ batch ยังไม่สามารถควบคุม *Listeria* spp. ได้ ทำให้ *Listeria* spp. ที่เหลือรอดจากการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อหลังการปฏิบัติงานไม่ได้ลดลงหรือหมดไป หรืออาจเพิ่มขึ้นระหว่างที่มีการผลิตเป็นผลให้เมื่อเวลาของการผลิตผ่านไปคล้ายกับที่มีการปนเปื้อนอยู่อย่างสม่ำเสมอ



ภาพที่ 4.10 ความชุกของ *Listeria* spp. แบ่งตามเวลาของการผลิต

ในการหาแหล่งของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง ได้แบ่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมตามระดับความเสี่ยงในการปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ออกเป็น 3 โซน ตามที่ระบุในหัวข้อ 3.4.3 (บทที่ 3) จากผลการ swab ในพื้นผิวทั้ง 3 โซน พบว่ามีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในโซนที่ 1, 2 และ 3 คิดเป็นความชุกได้ร้อยละ 1.1, 5.8 และ 13.4 ตามลำดับ โดย *Listeria* spp. ที่พบในตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 401 ตัวอย่างเมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิด พบว่าเป็น *L. innocua* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 82.3 ของตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้งหมดที่ปนเปื้อน *Listeria* spp. รองลงมาเป็น *L. welshimeri* ร้อยละ 11.2, *L. seeligeri* ร้อยละ 5.5 และ *L. monocytogenes* ร้อยละ 1.0 ดังผลแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งการพบ *L. innocua* เด่นกว่าการพบ *L. monocytogenes* และ *Listeria* ชนิดอื่น ๆ นั้น มีการพบลักษณะนี้เช่นกันในงานวิจัยของ Capita และคณะ (2001) และ Barros และคณะ (2007) ซึ่งการพบ *Listeria* ชนิดใดชนิดหนึ่งเด่นนั้นขึ้นอยู่กับเขตพื้นที่ที่พบ เนื่องจากในแต่ละพื้นที่ที่มีความชุกของ *Listeria* แต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังเช่นในงานวิจัยของ Chambel และคณะ (2007) ซึ่งศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* ชนิดต่างๆ ในโรงงานในแต่ละพื้นที่ (region) ของประเทศโปรตุเกส พบความชุกของ *L. monocytogenes* เด่นในพื้นที่เขต South Portugal ขณะที่พบความชุกของ *L. innocua* เด่นในพื้นที่เขต Azores ส่วนในงานวิจัยของ Hofer และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาการปนเปื้อนของ *Listeria* ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิตเนื้อสัตว์แปรรูปในประเทศบราซิล รายงานว่าไม่พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* และพบเพียงการปนเปื้อนของ *L. welshimeri*, *L. seeligeri* และ *L. grayi* เท่านั้น

ตารางที่ 4.6 ความชุกและชนิดของ *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

<i>Listeria</i>	จำนวนตัวอย่างที่พบ	ร้อยละความชุก
<i>L. innocua</i>	330 (ร้อยละ 82.3)	4.32
<i>L. welshimeri</i>	45 (ร้อยละ 11.2)	0.59
<i>L. seeligeri</i>	22 (ร้อยละ 5.5)	0.29
<i>L. monocytogenes</i>	4 (ร้อยละ 1.0)	0.05
ทั้งหมด	401	

สำหรับการปนเปื้อนของ *L. innocua* ซึ่งมีความชุกสูงที่สุดในบรรดา *Listeria* ชนิดอื่นๆ จากตารางที่ 4.7 พบว่ามีความชุกมากอยู่ในพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ซึ่งเป็นพื้นผิวที่ไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์และยังอยู่ห่างไกลจากผลิตภัณฑ์ เช่น พื้น ท่อระบายน้ำ พบความชุกของเชื้อมากและมีชนิดของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่อย่างหลากหลายมากกว่าโซนอื่นนั้น เนื่องจากพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 โดยเฉพาะท่อระบายน้ำมีสภาพเย็นและเปียกชื้นอยู่ตลอดเวลา ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้ท่อระบายน้ำเป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ได้เป็นอย่างดี (Tompkin et al., 1999) การปนเปื้อนของ *L. innocua* ในสิ่งแวดล้อมของการผลิตพบว่ามีความชุกมากรองลงมาคือพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 แต่กลับพบท่อระบายน้ำของเครื่อง liquid N₂ chiller ซึ่งเป็นพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 มีความชุกของ *L. innocua* อยู่มากที่สุดถึงร้อยละ 78.7 ของพื้นผิวสิ่งแวดล้อมจากทุกโซน นอกจากนี้ในโซน 2 พบว่าที่สายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับโลหะมีความชุกของ *L. innocua* อยู่ถึงร้อยละ 13.2 ซึ่งทั้งสองจุดนี้ยังพบ *L. welshimeri* ร่วมอยู่ด้วย สำหรับความชุกของ *L. innocua* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้ออยู่ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีความชุกของเชื้ออยู่น้อย แต่ก็มีความเสี่ยงมากที่จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 เป็นพื้นผิวที่มีการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง

ตารางที่ 4.7 ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	<i>Listeria</i>		
		<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
1	สายพานออกจากเครื่องนึ่งไอน้ำ	1.1		
	มือพนักงาน QC หลังเครื่องนึ่งไอน้ำ	0.6		
	สายพานเข้าเครื่อง liquid N ₂ chiller	2.9		
	สายพานเข้าเครื่อง chiller	1.7		
	สายพานออกจากเครื่อง chiller	1.7		
	สายพานเครื่องหั่น	1.7		
	มือพนักงาน QC หลังหั่น	1.1		
	สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.1		
	สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง	2.3		0.6
	ถุงมือของพนักงาน QC ที่สายพานเครื่องแช่เยือกแข็งขาออก	1.1	0.6	
ถุงมือของพนักงานบรรจุ	1.1	1.1	0.6	
2	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller	78.7	1.0	
	หน้าจอบควบคุมของเครื่องหั่น	1.1	1.1	
	โครงเครื่องหั่น	1.1	1.1	
	กล่องควบคุมสายพานหลังหั่น	2.3		
	โต๊ะบรรจุสินค้า	1.1		
	สายพานเครื่องปิดผนึก และเครื่องตรวจจับโลหะ	13.2	4.6	
	พนักงานล้างเสียงถาดก่อนใช้	1.1		
	พนักงานล้างเสียงถาดใช้แล้ว	1.1		

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	<i>Listeria</i>		
		<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
3	พื้นบริเวณเครื่องปรุงรส	7.5	1.1	
	พื้นห้องหัน	15.5		0.6
	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง	0.6	5.7	1.1
	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง	23.6	6.9	1.7
	พื้นห้องบรรจุ	16.1	1.7	6.3
	มือพนักงานทำความสะอาดโซน 3	2.9		

สำหรับ *L. welshimeri* (ตารางที่ 4.7) พบการปนเปื้อนของเชื้อมากที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ที่พบความชุกของ *L. welshimeri* อยู่มากได้แก่ ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง ผนังของเครื่องแช่เยือกแข็ง พื้นห้องบรรจุ และพื้นบริเวณเครื่องปรุงรส ตามลำดับ พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 ที่พบความชุกของ *L. welshimeri* ได้แก่ สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ หน้าจอควบคุมของเครื่องหัน โครงเครื่องหัน และท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ตามลำดับ และการปนเปื้อนของ *L. welshimeri* ในโซน 1 พบที่ถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพที่สายพานขาออกของเครื่องแช่เยือกแข็ง และถุงมือของพนักงานบรรจุเท่านั้น

เมื่อพิจารณาการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* พบความชุกมากที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 3 ได้แก่ พื้นห้องบรรจุ ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง และพื้นห้องหัน ตามลำดับ แต่ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 2 ซึ่งเป็นโซนที่อยู่ระหว่างโซน 3 กับโซน 1 แต่อย่างไรก็ตามกลับพบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซน 1 โดยพบการปนเปื้อนที่พื้นผิวของสายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง และถุงมือของพนักงานบรรจุ

ในกรณีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ที่พบในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตนี้ ตลอดระยะเวลาของแผนการสุ่มเก็บตัวอย่างพบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* อยู่ 4 ตัวอย่าง คิดความชุกที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมได้เท่ากับร้อยละ 0.05 โดยเป็นการปนเปื้อนของ

ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในโซน 1 คือตะแกรงต่อจากสายพานขาออกของเครื่องแช่เยือกแข็ง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในโซน 2 คือถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ และตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในโซน 3 คือพื้นห้องบรรจุ

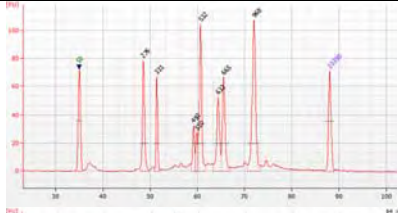

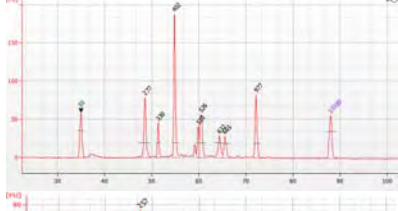

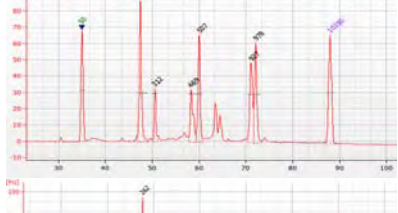

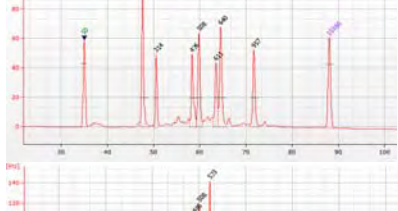

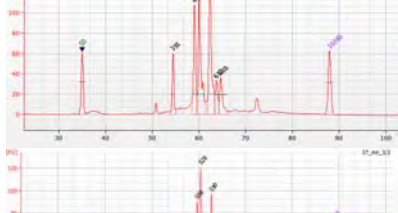

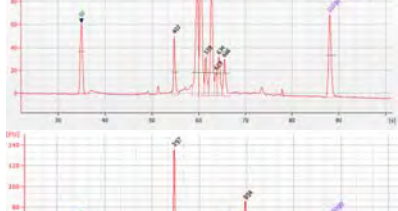

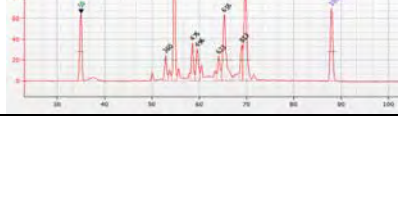

4.4 ความชุกของ *Listeria* ชนิดต่างๆในระดับสายพันธุ์

ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตด้วยวิธี RAPD พบว่าจากตัวอย่าง *L. innocua* 342 ตัวอย่าง ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย 12 ตัวอย่าง และพบในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 330 ตัวอย่าง จำแนกได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LI 1, 2 และ 3 โดยพิจารณาจากขนาด (หน่วย base pair; bp) ของชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่ม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากภาพ gel electrophoresis เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในสายพันธุ์หลักได้ แต่การพิจารณาเส้นกราฟจากกราฟ electropherogram จะทำให้ทราบถึงจำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากกราฟ electropherogram ทำให้สายพันธุ์ LI 1 แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 4 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LI 1.1, LI 1.2, LI 1.5 และ LI 1.6 และสายพันธุ์ LI 2 แบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 2 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LI 2.1 และ LI 2.2 ซึ่งในสายพันธุ์ย่อยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอส่วนใหญ่คล้ายกันในกลุ่มของแต่ละสายพันธุ์ แต่จะมีดีเอ็นเอบางชิ้นที่ทำให้เกิดความแตกต่างเป็นสายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LI 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย ซึ่งแต่ละตัวอย่างในสายพันธุ์ย่อยเดียวกันมีผลผลิตลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอคลาดเคลื่อนกันไม่เกิน 5% ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอนั้น ดังแสดงผลในตารางที่ 4.8 โดยเส้นกราฟที่มีขนาด 50 และ 10,380 bp เป็น lower และ upper marker ตามลำดับ และไม่พิจารณาเส้นกราฟของชิ้นดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ย่อยเป็นไปเพราะความแตกต่างของตัวเชื้อ ไม่ใช่เป็นเพราะปัจจัยแวดล้อมในการวิเคราะห์ เช่น วิธีการวิเคราะห์ อุปกรณ์เครื่องมือ หรือผู้วิเคราะห์ เนื่องจากในแต่ละสายพันธุ์ย่อยมีจำนวน *Listeria* หลายตัวอย่างที่วิเคราะห์ในวันและเวลาที่ต่างกัน แต่ยังได้ผลการจำแนกที่เหมือนกัน รวมทั้งในงานวิจัยนี้มีตัวอย่างควบคุมทั้งแบบ negative และ positive ควบคุมการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มอยู่ ดังนั้นผลการวิเคราะห์ของสายพันธุ์ย่อยของแต่ละสายพันธุ์จึงเกิดขึ้นเนื่องจากการความแตกต่างของตัวเชื้อเอง ซึ่ง Fennesbech Vogel และคณะ (2001) รายงานว่าความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น ปัจจัยจากกระบวนการผลิต การสลับใช้สารฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์เป็นกรดและด่าง หรือการเปลี่ยนแปลงชนิดสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อบ่อยๆ เป็นสาเหตุให้

เชื้อมีการปรับตัวและเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมเพื่อความอยู่รอด

เมื่อพิจารณาความชุกของ *L. innocua* ทั้ง 3 สายพันธุ์หลักแสดงดังในตารางที่ 4.8 พบสายพันธุ์ LI 1.1 ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายและดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง โดยมีร้อยละความชุก 77.1 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ปนเปื้อน *L. innocua* รองลงมาคือสายพันธุ์ LI 2.2 (ร้อยละ 11.5), LI 1.2 (ร้อยละ 4.1), LI 1.6 (ร้อยละ 3.5), LI 2.1 (ร้อยละ 1.8), LI 3 (1.8) และ LI 1.5 (ร้อยละ 0.3) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 ความชุกและสายพันธุ์ของ *L. innocua* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง (^a จำนวนตัวอย่างที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย)

กราฟ electropherogram	ภาพ gel electrophoresis	สายพันธุ์	จำนวน ตัวอย่าง	ร้อยละ ความชุก
		LI 1.1	262 (12 ^a)	77.1
		LI 1.2	14	4.1
		LI 1.5	1	0.3
		LI 1.6	12	3.5
		LI 2.1	6	1.8
		LI 2.2	39	11.5
		LI 3	6	1.8

L. innocua LI 1.1 ปนเปื้อนอยู่บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในทุกโซน และพบบนวัสดุพื้นผิวที่หลากหลาย ได้แก่ สเตนเลส พลาสติก และยาง ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือ ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller (ร้อยละ 58.6) ที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนเข้ามาที่สายพานเข้าเครื่อง liquid N₂ chiller (ร้อยละ 2.3) ซึ่งพื้นผิวในโซน 1 โดยที่ท่อระบายก๊าซนี้ยังพบ *L. innocua* หลากหลายสายพันธุ์มากกว่าพื้นผิวอื่นๆที่พบ *L. innocua* เช่นกัน โดยนอกจาก *L. innocua* LI 1.1 แล้วยังพบสายพันธุ์ LI 1.2, LI 1.6 LI 2.1 และ LI 2.2 นอกจากนี้แหล่งการปนเปื้อนอื่นๆ ร่องลงมา เช่น สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ (ร้อยละ 7.5) โต๊ะบรรจุ (ร้อยละ 1.1) และมือพนักงานบรรจุ (ร้อยละ 0.6) แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนข้ามระหว่างจุดเหล่านี้ โดยสายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ มือพนักงานบรรจุสัมผัสกับสายพานดังกล่าวหรือสัมผัสกับถุงบรรจุที่สัมผัสกับสายพานอีกที่ทำให้มีโอกาสที่เชื้อปนเปื้อนข้ามจากสายพานลงไปในการผลิตภัณฑ์ได้ นอกจากนี้สายพานเครื่องหั่น (ร้อยละ 1.7) ก็เป็นอีกเส้นทางของการปนเปื้อนของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งถึงแม้ว่ามีการใช้มาตรการในการกำจัดเชื้อไปแล้วก่อนเริ่มการเก็บตัวอย่าง แต่ก็ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อที่ตำแหน่งนี้อาจเนื่องจากเครื่องหั่นมีชอกมุมต่างๆที่ยากต่อการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้อย่างทั่วถึง จึงเป็นแหล่งซุกซ่อนของเชื้อได้เป็นอย่างดี

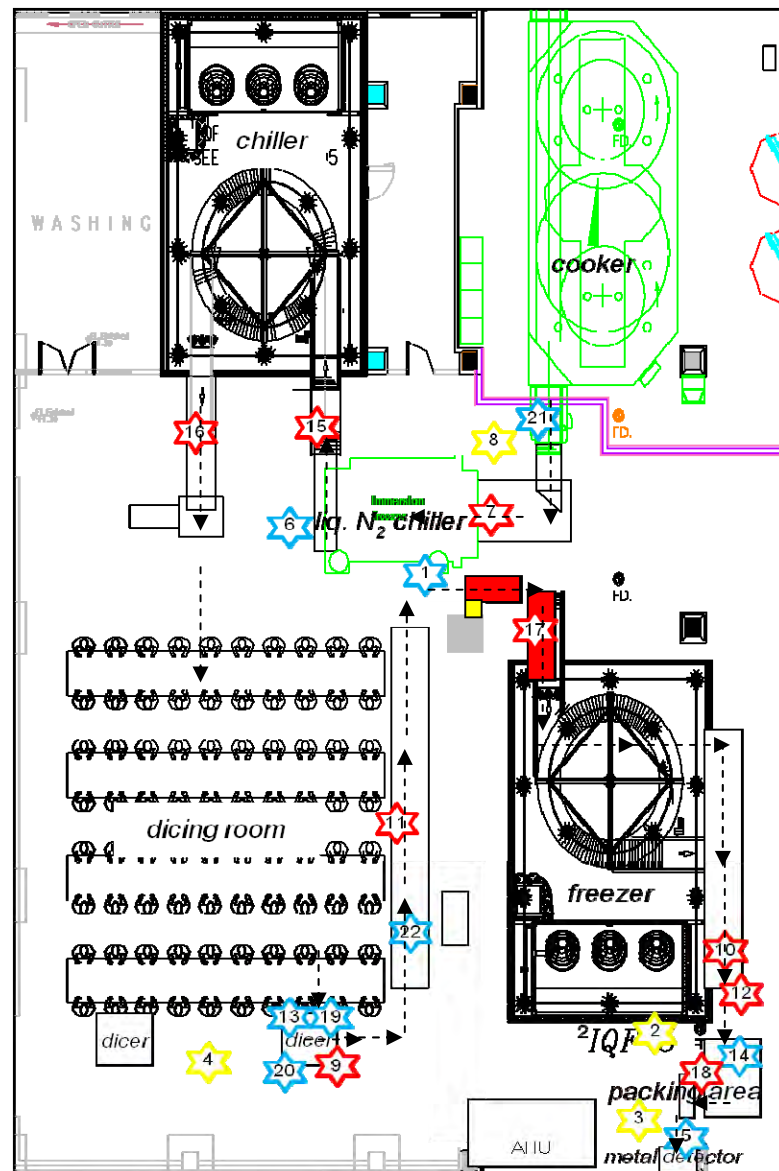
ตารางที่ 4.9 ความชุกของ *L. innocua* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	สายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i>						
		LI 1.1	LI 1.2	LI 1.5	LI 1.6	LI 2.1	LI 2.2	LI 3
1	สายพานออกจากเครื่องบรรจุสุก				0.6			
	สายพานเข้าเครื่อง liq. N ₂ chiller	2.3					0.6	
	สายพานเข้าเครื่อง chiller	0.6					0.6	
	สายพานออกจากเครื่อง chiller	0.6	0.6					
	สายพานเครื่องหั่น	1.7						
	ถุงมือของพนักงาน QC หลังหั่น	1.1						
	สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง	0.6						
	สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.1	0.6					

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ความชุกของ *L. innocua* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	สายพันธุ์ของ <i>L. innocua</i>						
		LI 1.1	LI 1.2	LI 1.5	LI 1.6	LI 2.1	LI 2.2	LI 3
1	ถุงมือพนักงานเกลี่ยสินค้าที่	1.1						
	สายพานของเครื่องแช่เยือกแข็ง							
	ถุงมือของพนักงานบรรจุ	0.6	0.6					
2	กรอบทางออกจากเครื่องปรุงสุก	0.6						
	ถาดรองใต้สายพานเครื่องปรุงสุก		0.6					
	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller	58.6	0.6		2.9	2.3	9.2	
	ถาดรองเศษใต้สายพาน liquid N ₂ chiller	4.0						
	หน้าจอควบคุมของเครื่องหัน	0.6						
	โครงเครื่องหัน	0.6						1.1
	กล่องควบคุมสายพานหลังหัน	1.1					0.6	
	โต๊ะบรรจุสินค้า	1.1						
	สายพานเครื่องปิดผนึก และเครื่องตรวจจับโลหะ	7.5			1.7			0.6
	สายพานลำเลียงถาด	0.6						
3	ถุงมือพนักงานลำเลียงถาดใช้แล้ว	0.6						
	พื้นห้องหัน	9.8	1.1		1.1		2.3	0.6
	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง							0.6
	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง	22.4		0.6				0.6
	พื้นห้องบรรจุ	14.4	0.6			0.6	0.6	

จากภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า *L. innocua* LI 1.1 ที่พบในบริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ อยู่อย่างกระจัดกระจายทั่วบริเวณการผลิตและพบอยู่ในทุกขั้นตอนของกระบวนการผลิต



ภาพที่ 4.11 แผนผังแสดงการพบ *L. innocua* LI 1.1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดยเครื่องหมายสีแดงแทนพื้นผิวไนโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวไนโซน 2 สีเหลืองแทนพื้นผิวไนโซน 3 และลูกศรเส้นประแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.10 หมายเลขกำกับแหล่งที่พบ *L. innocua* LI 1.1 ในแผนผังแสดงพื้นที่ของบริเวณการผลิต

หมายเลข ^a	จุด swab
1	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller
2	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
3	พื้นห้องบรรจุ
4	พื้นห้องหัน
5	สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ
6	ถาดรองเศษใต้สายพานออกจากเครื่อง liquid N ₂ chiller
7	สายพานเข้าเครื่อง liquid N ₂ chiller
8	พื้นบริเวณเครื่องปรงสุก
9	สายพานเครื่องหัน
10	สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง
11	ถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการหัน
12	ถุงมือของพนักงานเกลี่ยสินค้าที่สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง
13	ตู้ควบคุมเครื่องหัน
14	โต๊ะบรรจุ
15	สายพานเข้าเครื่อง chiller
16	สายพานออกจากเครื่อง chiller
17	สายพานเข้าเครื่องแช่เยือกแข็ง
18	มือพนักงานบรรจุ
19	หน้าจอควบคุมเครื่องหัน
20	โครงเครื่องหัน
21	กรอบทางออกของเครื่องปรงสุก
22	สายพานลำเลียงถาด

^a เรียงลำดับตามความซุก

การดำรงอยู่ของ *L. innocua* LI 1.1 ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ แสดงให้เห็นว่าเป็น *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตนี้เป็นเชื้อที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ในบริเวณการผลิต เนื่องจากพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 นี้อยู่ตลอดระยะเวลา 3 เดือนของการสุ่มเก็บตัวอย่าง

Autio และคณะ (2003) รายงานว่า *L. monocytogenes* ที่อาศัยแบบคงอยู่จะมีความแตกต่างในระดับยีนส์ (genetically distinct) จาก *L. monocytogenes* ที่พบปนเปื้อนอยู่แบบชั่วคราว (sporadic) โดย *L. monocytogenes* ที่อาศัยแบบคงอยู่จะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของโรงงานผลิต เพื่อให้สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตต่อไปได้ มีงานวิจัยหลายที่ให้เหตุผลถึงการเป็นเชื้อที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ดังนี้ : (1) เชื้อพบได้ทั่วไปมากกว่าสายพันธุ์อื่น หรืออาจเข้ามาปนเปื้อนอยู่ในโรงงานก่อน (Wulff et al., 2006); (2) เชื้อแข่งขันการเจริญเติบโต (outcomplete) ได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่น (Lopez et al., 2008); (3) เชื้อสร้างสภาวะเพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (colonize) ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น เช่น สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีกว่า; (4) เชื้อทน (resistant) ต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่า ซึ่งการทนต่อสารฆ่าเชื่อนั้นอาจเกิดจากการเกิดไบโอฟิล์ม (Heir et al., 2004; Pan, Breidt & Kathariou, 2006) ดังเช่นในผลงานวิจัยของ Lundén, Autio และ Korkeala (2002) ซึ่งศึกษาการถ่ายโอนของการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ระหว่างโรงงานผลิตเนื่องจากเครื่องหั่น โดยการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) พบว่าสามารถจำแนก *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิตได้ 4 สายพันธุ์ (type) โดยมี *L. monocytogenes* PFGE type I ปนเปื้อนแบบคงอยู่มากที่สุด ในบริเวณการหั่น โดยเป็นการปนเปื้อนเนื่องจากการสะสมของเชื้อที่เครื่องหั่นมากกว่าเป็นการปนเปื้อนเข้ามาที่วัตถุดิบ จากนั้นจึงได้ศึกษาการเกาะติดของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆบนผิวแผ่นสเตนเลส พบว่า *L. monocytogenes* PFGE type I นี้มีความสามารถในการเกาะติดบนพื้นผิวสเตนเลสได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น และมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสาร quaternary ammonium compound ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อชนิดหนึ่งสูงกว่าของสายพันธุ์อื่น จึงเป็นผลทำให้สายพันธุ์นี้หลีกเลี่ยงจากการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อหรืออาจอยู่ในชอกมุมที่ล้างทำความสะอาดได้ยาก จากนั้นจึงเจริญเติบโต และคงอยู่ต่อไป ซึ่งในงานวิจัยของ Fannesbech Vogel และคณะ (2001) พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* สายพันธุ์หนึ่ง (RAPD type) ปนเปื้อนอยู่แบบคงอยู่ในโรงงานผลิตปลาแซลมอน (salmon) รวมวันแห่งหนึ่งนานถึง 8 เดือน ขณะที่ Miettinen และคณะ (1999) พบการปนเปื้อนแบบคงอยู่ของ *L. monocytogenes* (PFGE type) ในโรงงานผลิตไอศกรีมแห่งหนึ่งนานถึง 7 ปี และ Unnerstad

และคณะ (1996) พบการปนเปื้อนแบบคงอยู่ของ *L. monocytogenes* (PFGE type) ในโรงนมแห่งหนึ่งนานถึง 7 ปี เช่นกัน

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายและตัวอย่างพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งปนเปื้อนรวม 46 ตัวอย่าง ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ตัวอย่าง และพบในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 45 ตัวอย่าง จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วย 4 ไพรมเมอร์ จำแนก *L. welshimeri* ได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LW 1, 2 และ 3 ซึ่งสายพันธุ์ LW 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 5 สายพันธุ์ย่อย ได้แก่ LW 1.1, LW 1.5, LW 1.6, LW 1.7 และ LW 1.8 ดังผลแสดงในตารางที่ 4.11 โดยสายพันธุ์ย่อยมีขนาดซันดีเอ็นเอส่วนใหญ่อคล้ายกันในแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ แต่มีดีเอ็นเอบางชิ้นที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LW 2 และ LW 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย ซึ่งแต่ละตัวอย่างในสายพันธุ์เดียวกันมีผลิตภัณฑ์ RAPD ที่มีขนาดซันดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันไม่เกิน 5% ของขนาดซันดีเอ็นเอ

ความชุกของ *L. welshimeri* ทั้ง 3 สายพันธุ์หลักแสดงดังในตารางที่ 4.11 โดยพบสายพันธุ์ LW1.7 มีความชุกมากที่สุดในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต (ร้อยละ 37.5) รองลงมาคือสายพันธุ์ LW 1.1 มีความชุกร้อยละ 25.0, LW 2 (ร้อยละ 10.0), LW 3 (ร้อยละ 10.0), LW 1.6 (ร้อยละ 7.5), LW 1.8 (ร้อยละ 7.5) และ LW 1.5 (ร้อยละ 5.0) ตามลำดับ ซึ่งถึงแม้ว่าพบสายพันธุ์ LW1.7 มีความชุกมากที่สุดในสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามไม่พบสายพันธุ์ LW 1.7 นี้ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โดยตลอดระยะเวลาการสุ่มเก็บตัวอย่างพบผลิตภัณฑ์สุดท้ายปนเปื้อน *L. welshimeri* เพียง 1 ตัวอย่างโดยเป็น *L. welshimeri* สายพันธุ์ LW 1.5 ซึ่งมีความชุกในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตร้อยละ 5.0 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อในระดับสายพันธุ์เป็นการวิเคราะห์ถึงแหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนอย่างแท้จริง เนื่องจากแยกแยะได้ว่าเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เป็นหรือไม่ได้เป็นเชื้อเดียวกันกับที่ปนเปื้อน ณ จุดต่างๆในสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 4.11 ความชุกและสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ที่พบในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุก
แช่เยือกแข็ง (^a จำนวนตัวอย่างที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย)

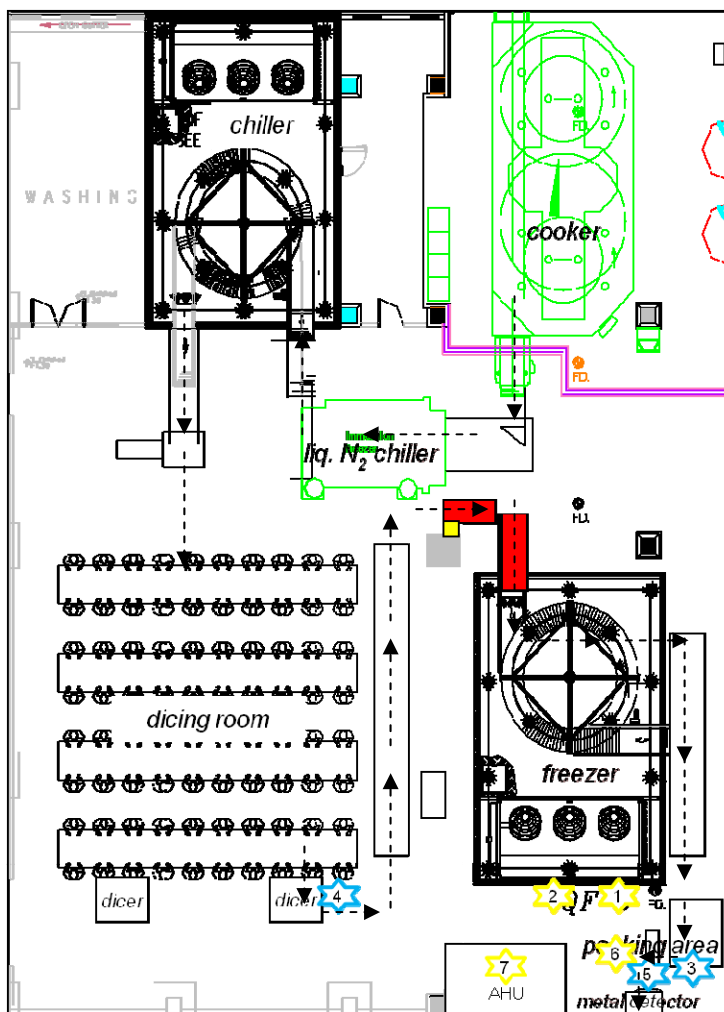
กราฟ electropherogram	ภาพ gel electrophoresis	สายพันธุ์	จำนวนตัวอย่างที่พบ	ร้อยละความชุก
		LW 1.1	10	25.0
		LW 1.5	2 (1 ^a)	5.0
		LW 1.6	3	7.5
		LW 1.7	15	37.5
		LW 1.8	3	7.5
		LW 2	4	10.0
		LW 3	4	10.0

จากตารางที่ 4.12 พบว่า *L. welshimeri* LW 1.7 ซึ่งมีความชุกมากที่สุดใบบรรดา *L. welshimeri* สายพันธุ์อื่น พบการปนเปื้อนมากที่ผนังและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง โดยคิดความชุกที่ตำแหน่งเหล่านี้ได้ร้อยละ 2.9 รองลงมาพบที่ถุงมือของพนักงาน QC และพนักงานบรรจุ หน้าจอควบคุมเครื่องหัน สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ และพื้นห้องบรรจุ ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้มีความชุกของ LW 1.7 อยู่ที่ร้อยละ 0.6 ส่วน *L. welshimeri* LW 1.1 ซึ่งมีความชุกมากรองลงมา (ความชุกร้อยละ 25.0) จาก LW 1.7 พบปนเปื้อนมากอยู่ที่สายพานเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะ (ร้อยละ 2.3) รองลงมาคือท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง (ร้อยละ 1.7) และผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง (ร้อยละ 1.1) โดยตำแหน่งพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* อยู่มากที่สุด คือผนังและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.12 ความชุกของ *L. welshimeri* สายพันธุ์ต่างๆ บนพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต แบ่งตามโซนการเก็บตัวอย่าง

โซน	จุด swab	สายพันธุ์ของ <i>L. welshimeri</i>						
		LW 1.1	LW 1.5	LW 1.6	LW 1.7	LW 1.8	LW 2	LW 3
1	มือพนักงานเกลี่ยสินค้าที่							
	สายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง			0.6				
	มือพนักงาน + มือ QC บรรจุ				0.6			0.6
2	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller							0.6
	หน้าจอควบคุมของเครื่องหัน	0.6			0.6			
	สายพานเครื่องปิดผนึก และเครื่องตรวจจับโลหะ	2.3		0.6	0.6	0.6		
3	พื้นบริเวณเครื่องบรรจุ						1.1	
	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.1			2.9	0.6	0.6	0.6
	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง	1.7	0.6		2.9	0.6		0.6
	พื้นห้องบรรจุ				0.6		1.1	

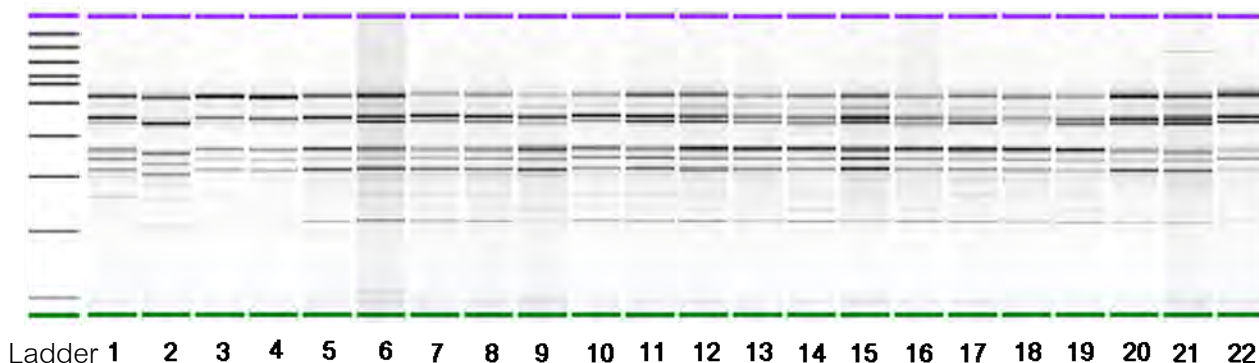
จากภาพที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าแหล่งสะสมของ LW 1.7 ในสิ่งแวดล้อมอยู่ที่บริเวณช่วงท้ายของกระบวนการผลิต ได้แก่ เครื่องแช่เยือกแข็ง และบริเวณการบรรจุ ยกเว้นที่หน้าจอบควบคุมเครื่องหัน และไม่พบการปนเปื้อนของ LW 1.7 ในบริเวณช่วงต้นของกระบวนการผลิตดังเช่นการพบ *L. innocua* ซึ่งอาจจะเนื่องจากบริเวณช่วงต้นของกระบวนการผลิตมี *L. innocua* เป็นเชื้อท้องถิ่นหลัก (dominant flora) อยู่ ทำให้เกิดภาวะแข่งขันกันในการอยู่อาศัย ซึ่งอาจเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้ส่วนใหญ่ไม่พบการอยู่ร่วมกันของ *Listeria* หลายชนิด ณ จุดเดียวกัน (Gilot and Content, 2002)



หมายเลข ^a	จุด swab
1	ที่ระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
2	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง
3	มือพนักงาน QC หลังบรรจุ
4	หน้าจอบควบคุมเครื่องหัน
5	สายพานเครื่องปิดผนึกถุง
6	พื้นห้องบรรจุ

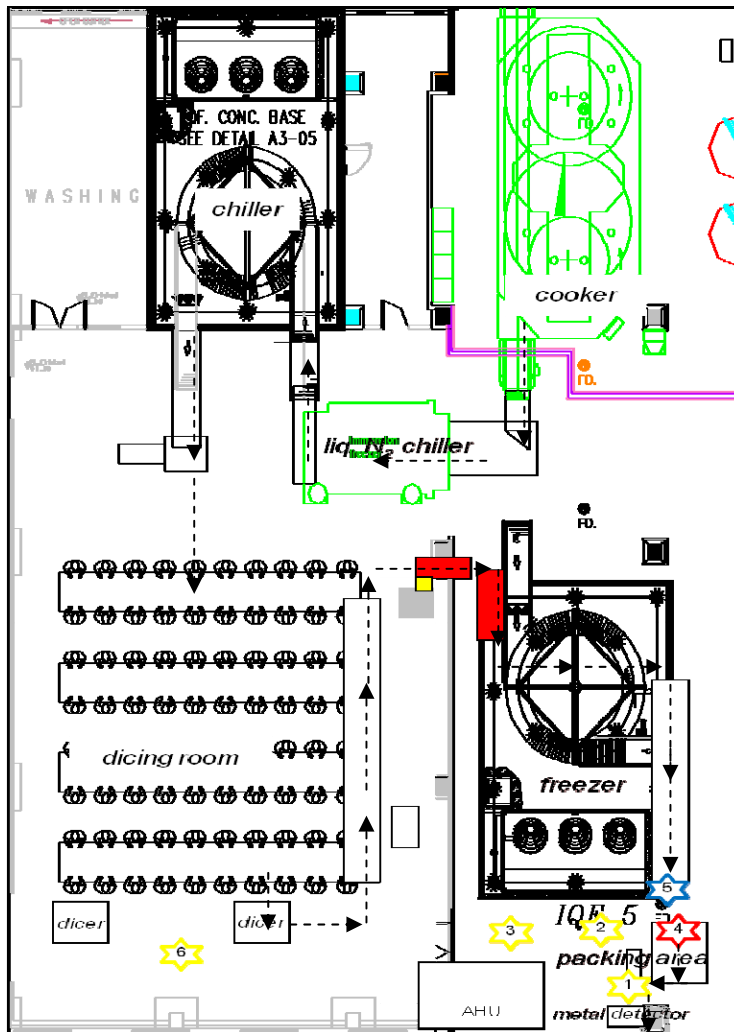
^a เรียงลำดับตามความซุก

ภาพที่ 4.12 แผนผังแสดงการพบ *L. welshimeri* LW 1.7 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดยเครื่องหมายสีแดงแทนพื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 เครื่องหมายสีเหลืองแทนพื้นผิวในโซน 3 และลูกศรเส้นประแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 4.13 ภาพ Gel electrophoresis ของ *L. seeligeri* 22 ตัวอย่าง ที่พบปนเปื้อนที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็ง

ในการจำแนก *L. seeligeri* ด้วยวิธี RAPD เพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนในระดับสายพันธุ์ พบว่าจำแนก *L. seeligeri* ที่พบในงานวิจัยนี้ได้เป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด กำหนดเป็น LS 1 โดยพบในผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ตัวอย่าง และพบที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิต 21 ตัวอย่าง ดังผลการจำแนกแสดงในภาพที่ 4.13 โดยแถบดีเอ็นเอของ *L. seeligeri* ที่พบในผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่ที่แถวหมายเลข 4 ของภาพ และถึงแม้ว่าพิจารณาจากภาพ gel electrophoresis จะเห็นความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง แต่ก็เพียงความแตกต่างของความเข้มข้นของซันดีเอ็นเอเท่านั้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟ electropherogram พบว่าแต่ละเส้นกราฟที่แสดงขนาดของซันดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างหรือมีความคลาดเคลื่อนกันไม่ถึง 5% ของขนาดซันดีเอ็นเอ นั้น จึงจัดว่าเป็นเชื้อในสายพันธุ์เดียวกัน โดยพบความชุกของ *L. seeligeri* LS 1 มากอยู่ที่พื้นห้องบรรจุ และเครื่องแช่เยือกแข็ง (ตารางที่ 4.7) และจากภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าพบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 อยู่บริเวณช่วงท้ายของกระบวนการผลิตเท่านั้น ซึ่งได้แก่ ในขั้นตอนการแช่เยือกแข็งและขั้นตอนการบรรจุ (ยกเว้นตัวอย่างพื้นห้องหัน)



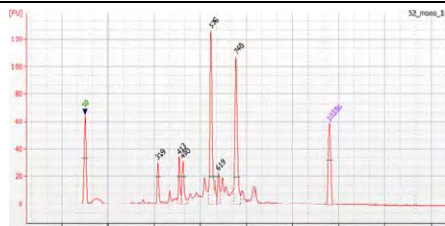

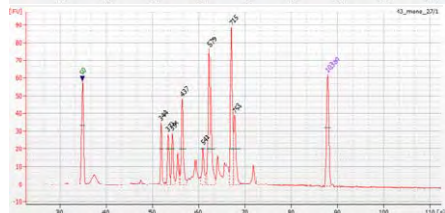

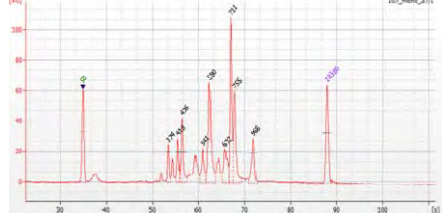

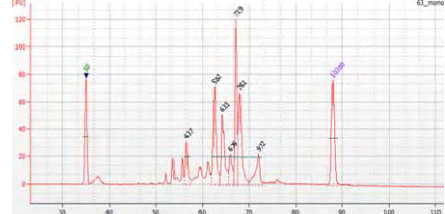

หมายเลข ^a	จุด swab
1	พื้นห้องบรรจุ
2	ท่อระบายน้ำของ เครื่องแช่เยือกแข็ง
3	ผนังเครื่องแช่เยือกแข็ง
4	มือพนักงานบรรจุ
5	ถาดรองเศษได้
6	สายพาน
6	พื้นห้องหั่น

^a เรียงลำดับตามความซุก

ภาพที่ 4.14 แผนผังแสดงการพบ *L. seeligeri* LS 1 ณ จุดต่างๆ ในบริเวณการผลิต โดย เครื่องหมายสีแดงแทนพื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายสีฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 สีเหลืองแทนพื้นผิวใน โซน 3 และลูกศรเส้นประแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

สำหรับ *L. monocytogenes* ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ และพบการปนเปื้อนของเชื้อที่พื้นผิวของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งเพียง 4 ตัวอย่าง จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มด้วย 4 ไพรมเมอร์ที่คัดเลือก จำแนกตัวอย่าง *L. monocytogenes* ที่พบได้ 1 สายพันธุ์หลัก ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ย่อย กำหนดเป็นสายพันธุ์ LM 1.1 และ LM 1.2 ดังผลแสดงในตารางที่ 4.13 โดยพบ LM 1.1 ที่พื้นห้องบรรจุ (2 ตัวอย่าง) และถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ และพบ LM 1.2 ที่ตะแกรงรับผลิตภัณฑ์ต่อจากสายพานออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.13 *L. monocytogenes* ที่พบ 4 ตัวอย่าง จำแนกในระดับสายพันธุ์

กราฟ electropherogram	ภาพ gel electrophoresis	สายพันธุ์	จุด swab	วันที่เก็บตัวอย่าง (วัน/เดือน/ปี)
		LM 1.2	ตะแกรงต่อจากสายพานออกจากของเครื่องแช่เยือกแข็ง	3/12/2552
		LM 1.1	พื้นห้องบรรจุ	13/1/2553
		LM 1.1	พื้นห้องบรรจุ	14/1/2553
		LM 1.1	ถุงมือพนักงานควบคุมคุณภาพหลังบรรจุ	19/1/2553

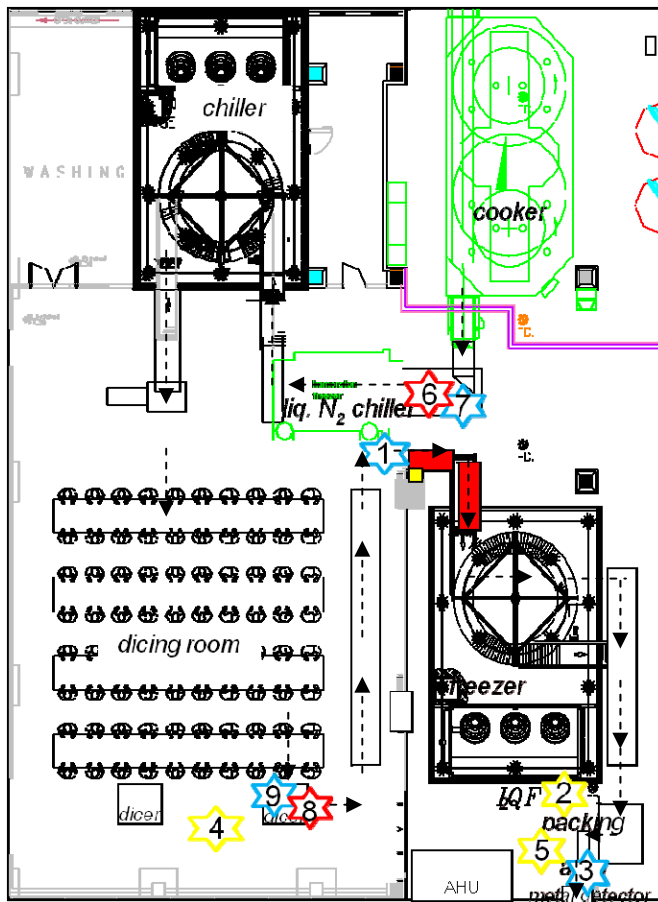
4.5 การประเมินความสอดคล้องของการปนเปื้อนของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อม

จากการวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* และในระดับสายพันธุ์ พบผลิตภัณฑ์สุดท้าย 12 ตัวอย่าง ปนเปื้อน *L. innocua* LI 1.1 คิดความชุกได้ร้อยละ 1.4 และพบผลิตภัณฑ์สุดท้าย ปนเปื้อน *L. welshimeri* LW 1.5 และ *L. seeligeri* LS 1 เชื้อละ 1 ตัวอย่าง (ร้อยละความชุก 0.1)

จากตารางที่ 4.14 แสดงพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตที่ปนเปื้อน *L. innocua* LI 1.1 ในวันเดียวกันหรือวันที่ใกล้เคียงกับวันที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ พบว่าในวันที่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้าย มักพบการปนเปื้อนที่ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ด้วยและที่ตำแหน่งนี้ยังพบจำนวนตัวอย่างที่ปนเปื้อนมากกว่าตัวอย่างจากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมอื่น ถึงแม้ว่าท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller จัดเป็นพื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 2 ซึ่งไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ แต่ก็ยังเป็นพื้นผิวที่อยู่ใกล้กับผลิตภัณฑ์ สามารถก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามสู่ผลิตภัณฑ์ได้ง่ายและมักเป็นพื้นที่ที่ถูกละเลยในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่ไม่ได้สัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 1 ส่วนใหญ่จะได้รับความเอาใจใส่ในการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อจึงมักไม่ใช่แหล่งสะสมของเชื้อที่อาศัยแบบคงอยู่ การพบเชื้อที่พื้นผิวสิ่งแวดล้อมในโซน 1 จะแสดงให้เห็นถึงแหล่งการปนเปื้อนแบบถ่ายโอน (transfer) และเส้นทางการปนเปื้อนของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ที่พื้นผิวนั้นสัมผัส ดังเช่นการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ในวันที่ 13/01/53 การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller โดยหยดน้ำควบแน่นที่หยดออกมาจากท่อระบายก๊าซอาจพาเชื้อปนเปื้อนลงบนสายพานของเครื่อง liquid N₂ chiller แล้วจึงปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ หรือการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ในวันนั้นอาจเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับเชื้อที่พบที่พื้นผิวสายพานของเครื่องหั่น ดังเช่นภาพแหล่งการปนเปื้อนแสดงในภาพที่ 4.15 แต่เนื่องจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller พบความชุกของเชื้อมากกว่า จึงมีความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งนี้จะเป็นแหล่งสะสมของ *L. innocua* LI 1.1 และก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามของเชื้อสู่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งนอกจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller สายพานของเครื่อง liquid N₂ chiller และสายพานของเครื่องหั่นแล้ว ในวันที่ใกล้เคียงหรือวันเดียวกันกับที่พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยังพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 ที่สายพานเครื่องปิดผนึก สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ หน้าจอควบคุมเครื่องหั่น ถาดรองเศษได้สายพานเครื่อง liquid N₂ chiller พื้นห้องหั่น ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง พื้นห้องบรรจุ และถุงมือพนักงานลำเลียงภาควัสดุใช้แล้ว

ตารางที่ 4.14 การพบ *L. innocua* LI 1.1 ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในวันที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อนหรือวันที่ใกล้เคียง

	วัน/เดือน/ปี ที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อน (จำนวนตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบเชื้อ)						
	15/11/52	20/11/52	21/11/52	14/12/52	04/01/53	13/01/53	16/01/53
	(4)	(1)	(1)	(1)	(3)	(1)	(1)
<u>แหล่งที่พบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม</u> (จำนวนตัวอย่าง)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4) พื้นห้องหัน (1)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4) พื้นห้องหัน (2)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4) สายพานเครื่องปิดผนึก (1) สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (6) สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1) ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง (1) พื้นห้องบรรจุ (1) ถุงมือพนักงานลำเลียง ถาดใช้แล้ว (1)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (5) ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง (2) สายพานเครื่อง liquid N ₂ chiller (1) สายพานเครื่องหัน (1) หน้าจอบควบคุมเครื่องหัน (1) ถาดรองเศษใต้สายพานเครื่อง liquid N ₂ chiller (1)	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller (4) ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง (4) สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ (1) พื้นห้องหัน (1) พื้นห้องบรรจุ (1)



หมายเลข ^a	จุด swab
1	ท่อระบายก๊าซของเครื่อง
2	liquid N ₂ chiller
3	ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง
4	สายพานเครื่องตรวจจับโลหะ
5	พื้นห้องหั่น
6	พื้นห้องบรรจุ
7	สายพานเข้าเครื่อง liquid N ₂ chiller
8	ถาดรองเศษได้สายพานออกจาก
9	liquid N ₂ chiller
	สายพานเครื่องหั่น
	หน้าจอบควบคุมเครื่องหั่น

^a เรียงลำดับตามรูป

ภาพที่ 4.15 แผนผังแสดงแหล่งการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 จากพื้นผิวสิ่งแวดล้อมผู้ผลิตภัณฑ์ โดยเครื่องหมายเลขสีแดงแทนพื้นผิวในโซน 1 เครื่องหมายเลขฟ้าแทนพื้นผิวในโซน 2 สีเหลืองแทนพื้นผิวในโซน 3 และลูกศรสีแดงแสดงเส้นทางของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.15 การพบ *L. innocua* ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกของเครื่อง liquid N₂ chiller

เดือน	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ / จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์	
	ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้า	ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์ออก
มกราคม	N	1/1
กุมภาพันธ์	9/10	N
มีนาคม	3/5	N
เมษายน	4/5	N
พฤษภาคม	7/11	N

N - ไม่พบเชื้อ

ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ที่พบว่าเป็นแหล่งการปนเปื้อนของ *L. innocua* LI 1.1 นั้นเป็นท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าของเครื่อง liquid N₂ chiller จากตารางที่ 4.15 เปรียบเทียบการพบ *L. innocua* ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออก พบว่าการปนเปื้อนอยู่ที่ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าเท่านั้น โดยท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าเครื่อง liquid N₂ chiller มีหน้าที่ดูดลมก๊าซ N₂ ที่ใช้ทำให้เนื้อไก่ที่เพิ่งออกจากเครื่องปรุงสุกที่มีอุณหภูมิ 80°C เย็นลงเหลือ 60°C ลม N₂ ที่ระบายออกในท่อระบายฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าจึงพาความร้อนจากเนื้อไก่ออกไปด้วย ทำให้ภายในท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้ามีอุณหภูมิลดลงในช่วงที่ *Listeria* สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ โดยท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าและออกมีอุณหภูมิลดอยู่ที่ 6°C และ -91°C ตามลำดับ ซึ่งถึงแม้ว่าอุณหภูมิภายในท่อระบายก๊าซฝั่งขาเข้าจะมีอุณหภูมิเพียง 6°C แต่ *Listeria* นั้นสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำถึง -0.4°C (ICMSF, 1996) รวมทั้งการสะสมของเศษเนื้อไก่ที่ถูกพาเข้าไปในท่อโดยแรงลมของก๊าซ N₂ ทำให้ *Listeria* สามารถใช้เศษเนื้อไก่ที่สะสมอยู่ในท่อเป็นอาหารในการเจริญเติบโต และเนื่องจากลักษณะของท่อระบายก๊าซที่สูงและไม่สามารถถอดแยกส่วนเพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้ และความเร่งรีบในการผลิต ทำให้การทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่จุดนี้มีความถี่ไม่เพียงพอและไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงพักระหว่างวันหรือหลังสิ้นสุดการผลิต จึงเป็นผลให้ท่อระบายก๊าซฝั่งผลิตภัณฑ์เข้าของเครื่อง liquid N₂ chiller เป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ได้เป็นอย่างดี

สำหรับ *L. welshimeri* จากการจำแนกในระดับสายพันธุ์ของ *L. welshimeri* ด้วยวิธี RAPD พบว่า *L. welshimeri* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เป็นสายพันธุ์ LW 1.5 ซึ่งพบสอดคล้องกับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต 1 ตัวอย่าง คือท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง แต่อย่างไรก็ตามพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในวันที่ 14 พฤศจิกายน 2552 แต่พบการปนเปื้อนของ LW 1.5 ที่ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งในวันที่ 18 ธันวาคม 2552 รวมทั้งท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งจัดเป็นพื้นผิวในโซน 3 แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบเส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริงของ *L. welshimeri* สู่อุณหภูมิผลิตภัณฑ์ อาจเนื่องจาก *L. welshimeri* มีความซุกตัว จึงมีโอกาสน้อยที่สุ่มเก็บตัวอย่างแล้วพบเชื้อนี้

กรณีการประเมินความสอดคล้องของ *L. seeligeri* LS 1 พบว่าวันที่พบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ไม่พบการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 ในสิ่งแวดล้อม แต่อย่างไรก็ตามก่อนพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ 4 วัน พบการปนเปื้อนที่พื้นผิวโซน 1 ซึ่งคือที่ถุงมือของพนักงานบรรจุ และอีก 2 วันหลังจากพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ พบการปนเปื้อนที่พื้นห้องบรรจุและท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* LS 1 จากพื้นผิวในโซน 3 มาสู่พื้นผิวในโซน 1 แล้วจึงปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

4.6 การจัดการความเสี่ยง

จากการประเมินแหล่งสะสมของ *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ พบที่ระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller เป็นแหล่งสะสมสำคัญของ *L. innocua* และ *L. welshimeri* ทั้งสายพันธุ์หลักที่มีการปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ และสายพันธุ์ย่อยอื่นๆ ดังนั้นจึงได้มีการจัดการกับที่ระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์และในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่เกิดการปนเปื้อนเนื่องจากการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจากที่ระบายก๊าซ โดยถึงแม้ว่าที่ระบายก๊าซนั้นมีความสูงแต่ก็แก้ไขให้สามารถถอดแยกออกเป็นท่อน เพื่อให้สามารถล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อภายในท่อได้อย่างทั่วถึง แล้วจึงฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนและน้ำร้อน 70°C และทำฝาครอบปิดปากที่ระบายก๊าซขณะที่หยุดพักหรือไม่มีการผลิต เพื่อป้องกันหยดน้ำควบแน่นที่จะพาเชื้อภายในท่อติดมากับหยดน้ำ แล้วหยดออกมาปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ภายในบริเวณการผลิต หรือหยดลงบนพื้น ซึ่งพนักงานที่เดินผ่านอาจย่ำน้ำแล้วพาเชื้อกระจายไปยังจุดอื่น

สายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับโลหะเป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามภายในบริเวณการบรรจุ ซึ่งสายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับโลหะก่อให้เกิดการปนเปื้อนข้ามไปถึงถุงมือพนักงานบรรจุและถุงมือพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุได้ เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ไปมาของพนักงานในบริเวณบรรจุ ทำให้ *Listeria* ปนเปื้อนข้ามจากสายพานของเครื่องปิดผนึกและสายพานของเครื่องตรวจจับโลหะมาที่โต๊ะบรรจุหรือปนเปื้อนสู่ในผลิตภัณฑ์ได้ สายพานของเครื่องตรวจจับโลหะมักเปียกชื้นจากหยดน้ำควบแน่นที่เกาะอยู่ที่ผิวด้านนอกของบรรจุภัณฑ์อยู่เสมอ ดังนั้นจึงมีการรักษาพื้นผิวของสายพานนี้ให้อยู่ในสภาพที่แห้ง และใช้สารฆ่าเชื้อเช็ดทำความสะอาดที่สายพาน เนื่องจากไม่สามารถล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเครื่องปิดผนึกและเครื่องตรวจจับโลหะได้เหมือนเครื่องจักรอื่นๆ เช่น เครื่องหัน ที่มีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อในช่วงหยุดพักการผลิตระหว่างวันหรือหลังเสร็จสิ้นการผลิต เพราะจะกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเครื่อง แต่อย่างไรก็ตามมีการถอดแยกชิ้นส่วนของเครื่องตรวจจับโลหะ แล้วจึงทำความสะอาดและฆ่าเชื้อสายพานและส่วนประกอบต่างๆ เครื่องตรวจจับโลหะในวันที่ไม่มีการผลิต

ที่ระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งเป็นแหล่งสะสมของ *Listeria* ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามภายในบริเวณการบรรจุ ซึ่งมีการจัดการโดยใช้ถุงตาข่ายดักเศษเนื้อไก่ที่ออกมาจากที่ระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง เพื่อไม่ให้เศษเนื้อไก่กระจายเลอะเทอะอยู่บนพื้น ได้เปลี่ยนชนิดของสารฆ่าเชื้อในที่ระบายน้ำจากเดิมเป็นสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม peracetic acid เข้มข้น

3.0% เปลี่ยนเป็นสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compound เข้มข้น 1.5% (2,400 ppm) รวมทั้งใช้ไอน้ำร้อนฉีดพื้นบริเวณพื้นรอบเครื่องแช่เยือกแข็งด้วย

หลังการใช้มาตรการต่างๆในการจัดการแหล่งสะสมของ *Listeria* แล้วจึงสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์และพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตอีกครั้ง พบการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ 2 ตัวอย่างในระยะเวลา 1 เดือน โดยคิดเป็นความชุกได้ร้อยละ 0.2 โดยลดลงจากเดิม 1.6% โดยสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่พบในผลิตภัณฑ์หลังการจัดการพบว่าเป็น *L. innocua* LI 1.6 ซึ่งพบสายพันธุ์ LI 1.6 นี้สอดคล้องกับที่ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller ดังแสดงในตารางที่ 4.16 และกลับพบ *L. welshimeri* ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมของการผลิตมากกว่า *L. innocua* โดยพบว่า LW 1.7 ยังคงเป็นสายพันธุ์หลักของ *L. welshimeri* ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมทั้ง 3 โซน ได้แก่ โซน 1 พบที่ถุงมือของพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ โซน 2 พบที่หน้าจอบนเครื่องแช่เยือกแข็ง และโซน 3 พบที่ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง และบันไดเครื่องแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 4.16 ความชุกของ *Listeria* สายพันธุ์ต่างๆที่พบในสิ่งแวดล้อมของการผลิตหลังการจัดการความเสี่ยง

จุด swab	LI 1.1	LI 1.2	LI 1.6	LW 1.7	LW 1.8
มือพนักงานควบคุมคุณภาพหลังการบรรจุ				0.6	
หน้าจอบนเครื่องแช่เยือกแข็ง				1.7	0.6
ท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N ₂ chiller			0.6		
ท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็ง				1.7	
บันไดเครื่องแช่เยือกแข็ง				0.6	
พื้นห้องบรรจุ	1.7	0.6			

หลังจากการประเมินความเสี่ยงของแหล่งสะสม *Listeria* ในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิตที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ และได้ปฏิบัติใช้มาตรการจัดการความเสี่ยงแล้ว ถึงแม้ว่ามีความชุกของ *Listeria* ในกระบวนการผลิตลดลง แต่ยังคงพบการปนเปื้อนของ *Listeria* หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์และสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต ดังเช่นในงานวิจัยของ Beresford และคณะ (2001) และ Gudbjornsdottir และคณะ (2004) ที่พบว่ายังพบการปนเปื้อนของ *L.*

monocytogenes อยู่หลังการปฏิบัติใช้มาตรการจัดการเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งถึงแม้ว่ายังไม่สามารถกำจัดการปนเปื้อนของ *Listeria* ให้หมดไปได้ แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการควบคุมเชื้อให้มีการปนเปื้อนอยู่น้อยที่สุด โดยการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออย่างถูกวิธีและมีความถี่ที่เหมาะสม เนื่องจากการพบ *Listeria* ที่อาศัยแบบคงอยู่ (persistence) ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าจำเป็นจะต้องมีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึงตามซอกมุมของพื้นผิวต่างๆของสิ่งแวดล้อมมากขึ้น นอกจากนี้ในงานวิจัยจึงเสนอมาตรการจัดการเพื่อใช้ควบคุมและลดการปนเปื้อนของ *Listeria* ต่อไป โดยให้มีการทบทวนวิธีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ใช้อยู่เพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพของการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ โดยสลับลำดับของการฆ่าเชื้อจากเดิมหลังการทำความสะอาดแล้วจะฉีดพ่นด้วย peracetic acid แล้วตามด้วยการฉีดพ่นไอน้ำร้อน ซึ่งการใช้กรดก่อนจะทำให้ชั้นฟิล์มของเหลวค้างอยู่บนพื้นผิวทำให้การใช้ไอน้ำร้อนมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการฆ่าเชื้อที่หลงเหลืออยู่บนพื้นผิว (Koutsoumanis and Sofos, 2004) จึงขอเสนอให้เปลี่ยนลำดับการฆ่าเชื้อเป็นการใช้ไอน้ำร้อนก่อนแล้วจึงฉีดพ่นด้วย peracetic acid นอกจากนี้ควรมีการขจัดคราบหรือวัตถุดิบทรีย์ (organic matter) ที่หลงเหลืออยู่หลังจากการผลิต เช่น เศษเนื้อไก่ที่อาจติดอยู่ที่สายพานหรือตามซอกมุมของเครื่องจักร ให้หมดไปก่อนการล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ เนื่องจากสารอินทรีย์เหล่านี้จะลดประสิทธิภาพการทำงานของสารฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะสารฆ่าเชื้อในกลุ่ม quaternary ammonium compound และคลอรีน ซึ่งเป็นสารที่ใช้ฆ่าเชื้อในสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้ รวมทั้งสารอินทรีย์จะทำให้ความเข้มข้นจริงของสารฆ่าเชื้อที่อยู่บนพื้นผิวไม่เป็นไปตามที่กำหนด ซึ่งอาจทำให้เกิดการปรับตัวของ *Listeria* ในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ (Aase และคณะ, 2000) นอกจากนี้ในการกำจัด *Listeria* ที่สะสมอยู่ในท่อระบายน้ำนั้น อาจใช้การควบคุมทางชีวภาพ โดย Zhao และคณะ (2006) พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis subsp. Lactis* C-1-92 และ *Enterococcus durans* 152 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* ได้ทั้งในหลอดทดลองและในรูปไบโอฟิล์มที่อุณหภูมิ 4 ถึง 37°C และเมื่อนำมาใช้จริงในท่อระบายน้ำของโรงงานผลิตเนื้อไก่สด พบว่าการใช้แบคทีเรียสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดจำนวนของ *Listeria* spp. ในท่อระบายน้ำได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 3 ถึง 26°C

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. innocua* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ OMP-01 (5' GTTGGTGGCT 3') ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. welshimeri* ได้ดีที่สุดคือ ไพรเมอร์ HLWL 74 (5' ACGTATCTGC 3') และ HLWL 85 (5' ACAACTGCTC 3') ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถจำแนก *L. seeligeri* ได้ดีคือ ไพรเมอร์ OMP-01, HLWL 74, HLWL 85 และ UFS (5' TTATGTAAAACGAC GGCCAGT 3') และในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบสุ่มนั้น ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบมีผลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตของปฏิกิริยา

2. วิธี RAPD เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* โดยมีความสามารถในการจำแนกหัดเทียบเท่ากับวิธีที่ใช้ในทางการค้า (วิธี ribotyping) รวมทั้งมีความสามารถในการทำซ้ำได้

3. ผลิตรกัณฑ์สุดท้ายมีการปนเปื้อน *L. innocua* 12 ตัวอย่าง *L. welshimeri* 1 ตัวอย่างและ *L. seeligeri* 1 โดยความชุกในการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในผลิตรกัณฑ์สุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1.6 แต่ไม่พบการปนเปื้อนในผลิตรกัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการผลิต

4. รอบการผลิตช่วงกลางวันและกลางคืนไม่มีผลต่อการพบ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อม แต่เวลาของการผลิตในรอบการผลิตแต่ละช่วงมีผลต่อการพบ *Listeria* spp. ที่พื้นผิวของไซน 3 ส่วนไซน 1 และ 2 มีการพบ *Listeria* spp. อย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการผลิต

5. ในการหาแหล่งของการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ในสิ่งแวดล้อมของบริเวณการผลิต มีการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. มากในพื้นที่ผิวของทั้งไซน 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยเป็น *L. innocua* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 82.3 ของตัวอย่างที่พบ *Listeria* spp. รองลงมาเป็น *L. welshimeri* ร้อยละ 11.2, *L. seeligeri* ร้อยละ 5.5 และ *L. monocytogenes* ร้อยละ 1.0

6. ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Listeria* ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตรกัณฑ์สุดท้ายและสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิตด้วยวิธี RAPD สามารถจำแนกตัวอย่าง *L. innocua* ได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LI 1, 2 และ 3 โดยสายพันธุ์ LI 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 4 สายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LI 2 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 2 สายพันธุ์ย่อย สำหรับสายพันธุ์ LI 3 ไม่มีสายพันธุ์ย่อย โดย *L. innocua* ที่ปนเปื้อนในผลิตรกัณฑ์สุดท้ายเป็นสายพันธุ์ LI 1.1

และดำรงอยู่มากที่สุดในสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง โดยการดำรงอยู่ของ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1 ในกระบวนการผลิตเนื้อไก่ปรุงสุกแช่เยือกแข็งนี้เป็นการอาศัยแบบคงอยู่ สำหรับ *L. welshimeri* จำแนกได้ 3 สายพันธุ์หลัก กำหนดเป็นสายพันธุ์ LW 1, 2 และ 3 โดยสายพันธุ์ LW 1 แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ย่อยได้อีก 5 สายพันธุ์ย่อย ส่วนสายพันธุ์ LW 2 และ LW 3 ไม่พบสายพันธุ์ย่อย โดย *L. welshimeri* ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสายพันธุ์ LW 1.5

สำหรับ *L. monocytogenes* จำแนกได้ 1 สายพันธุ์หลัก 2 สายพันธุ์ย่อย ส่วน *L. seeligeri* ในงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์เดียวกันทั้งหมด

7. การปนเปื้อนของ *L. innocua* สายพันธุ์ LI 1.1 ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้าย เกิดจากการปนเปื้อนข้ามจากท่อระบายก๊าซของเครื่อง liquid N₂ chiller เป็นหลัก เนื่องจากหยดน้ำควบแน่นที่หยดออกมาจากท่อระบายก๊าซพาเชื้อปนเปื้อนลงบนสายพานของเครื่อง liquid N₂ chiller แล้วจึงปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์

สำหรับการปนเปื้อนของ *L. welshimeri* สายพันธุ์ LW 1.5 ในผลิตภัณฑ์ ยังไม่พบเส้นทางการปนเปื้อนที่แท้จริงของ *L. welshimeri* สู่ผลิตภัณฑ์ ส่วนการปนเปื้อนของ *L. seeligeri* สายพันธุ์ LS 1 ในผลิตภัณฑ์ เกิดจากการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจากพื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในบริเวณบรรจุ และท่อระบายน้ำของเครื่องแช่เยือกแข็งสู่ผลิตภัณฑ์

8. การจัดการความเสี่ยงหลังการประเมินความเสี่ยงโดยหาแหล่งและเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* โดยการใช้วิธีทางอนุชีววิทยาทำให้ความชุกของ *Listeria* ที่พบในผลิตภัณฑ์ ลดลงจากร้อยละ 1.6 เหลือร้อยละ 0.2

9. การหาเส้นทางการปนเปื้อนของ *Listeria* จากสิ่งแวดล้อมในบริเวณการผลิตสู่ผลิตภัณฑ์เป็นเรื่องยาก ดังนั้นเมื่อตรวจพบ *Listeria* ที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนใดก็ตามต้องเร่งกำจัดและหาแนวทางป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อที่พื้นผิวของสิ่งแวดล้อมในโซนนั้นอีก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การแบ่งโซนของพื้นผิวสิ่งแวดลอมการผลิต แบ่งตามระดับความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคไปสู่ผลิตภัณฑ์ ดังนั้นโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทจำเป็นต้องมีการประเมินและจัดโซนของพื้นผิวของสิ่งแวดลอมของแต่ละโรงงานเอง เนื่องจากพื้นผิวของสิ่งแวดลอมของโรงงานผลิตอาหารแต่ละประเภทอาจมีระดับความเสี่ยงที่แตกต่างกัน
2. การวิเคราะห์ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์โดยใช้วิธี RAPD จำเป็นต้องมีการ standardize วิธีปฏิบัติการ และมีตัวอย่างควบคุมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสทุกครั้ง เพื่อความถูกต้องและความสม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์
3. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Listeria* ในระดับสายพันธุ์โดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา สามารถใช้เป็นแนวทางการติดตามหาแหล่งที่มาและเส้นทางการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆในโรงงานได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จริยา ชมวารินทร์ และคนอื่นๆ. PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ

พจน์ ศรีบุญลือ และคนอื่นๆ. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์คลัง นานาวิทยา ขอนแก่น,

มนตรี จุฬาวัดมนทล และคนอื่นๆ. ชีวเคมี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

วสันต์ จันทราทิตย์ และคนอื่นๆ. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. เนื้อไก่ชนิดแกลล์สโตเมสติกส์แช่เย็นแช่แข็ง: ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน. [ออนไลน์]. 2547. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/export/1301PS.xls> [2552, สิงหาคม 10]

สำนักมาตรฐานนำเข้าส่งออกสินค้าทั่วไป. สินค้าเนื้อไก่. [ออนไลน์]. 2549. แหล่งที่มา: http://www.dft.moc.go.th/the_files/16/level4/chicken.doc [2552, สิงหาคม 10]

สมาคมผู้ผลิตไก่เพื่อส่งออกไทย. Thai chicken meat export. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา:

สุวิมล กิรติพิบูล. การควบคุมจุลินทรีย์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1.

ภาษาอังกฤษ

Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., and Rørvik, L. 2000. Occurrence of and possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 62: 57-63.

Aguado, V., Vitas, A.I., and Garcia-Jalon, I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int. J. Food Microbiol. 90: 341-347.

Arumugaswamy, R. K., Ali, G. R. R., and Hamid, S. N. N. 1994. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 23: 117-121.

- Art, D., and Andre, P. 1991. Clinical and epidemiological aspects of Listeriosis in Belgium, 1985-1990. Zentralblatt fur Bakteriologie. 275(4): 549-556.
- Audurier, A., and Martin, C. 1989. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 8: 251-257.
- Aureli, P., and others. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Engl. J. Med. 342: 1236-1241.
- Autio, T., and others. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. Appl. Environ. Microbiol. 65: 150-155.
- Baily, J. S., Fletcher, D. L., and Cox, N. A. 1989. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. J. Food Prot. 52: 148-150.
- Barros, M. A. F., and others. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. Meat Sci. 76: 591-596.
- Beresford, M. R., Andrew, P. W., and Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* attaches to many materials found in food processing environment. J. Appl. Bacteriol. 90: 1000-1005.
- Bille, J. Epidemiology of Listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In Miller, A.J., Smith, J. L., and Somkuti, G. A. (eds.), Topics in industrial microbiology: foodborne Listeriosis, pp. 25-29. New York: Elsevier Science Publishing, 1990.
- Boerlin, P., Bannerman, E., Ischer, F., Rocourt, J., and Bille, J. 1995. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. Res. Microbiol. 146: 35-49.
- Bohaychuk, V. M., and others. 2006. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. J. Food Prot. 69(9): 2176-2182.
- Breer, C., and Schopfer, K. 1988. *Listeria* and food. Lancet ii: 1022.

- Broome, C. V., Gellin, B., and Schwartz, B. Epidemiology of Listeriosis in the United States. In Miller, A. J., Smith, J. L. and Somkuti, G. A. (eds.), Topics in Industrial Microbiology: Foodborne Listeriosis, pp. 61-65. New York: Elsevier Science Publishing, 1990.
- Buchanan, R. L., Damert, W. G., Whiting, R. C., and Van Schothorst, M. 1997. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. J. Food Prot. 60: 918-922.
- Byun, S.K., Jung, S.C., and Yoo, H.S. 2001. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. Int. J. Food Microbiol. 69: 227-235.
- CAC. Principles and guidelines for the conduct of a microbiological risk assessment (CAC/GL 30-1999). Rome: Codex Alimentarius Commission/FAO, 1999.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., and Garcia-Fernandez, M. C. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural /immunoassay for their detection. Int. J. Food Microbiol. 65: 75-82.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., and Kjelleberg, S. 2007. Use of 16s rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 73(1): 278-288.
- CDC. 1999. Update: Multisate outbreak of Listeriosis-United States, 1998-1999. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 47: 1117-1118.
- CDC. 2000. Update: Multisate outbreak of Listeriosis-United States, 1999-2000. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 49: 1129-1130.
- CDC. 2003. Update: Multisate outbreak of Listeriosis-United States, 2002-2003. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 52: 1156-1159.
- CFIA. Canada listeria outbreak: Costco Signature brand platters recalled. [online]. 2008. Available from: <http://www.inspection.gc.ca/english/corpaff/recarpp/2008e.html> [2010, August 21]

- Chambel, L., and others. 2007. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. Int. J. Food Microbiol. 116: 52-63.
- Choi, Y., Cho, S., Park, B., Chung, D., and Oh, D. 2001. Incidence and characterization of *Listeria* spp. from foods available in Korea. J. Food Prot. 64(4): 554-558.
- Colburn, K. G., Kaysner, C. A., Abeyta, C. J., and Wekell, M. M. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2007-2011.
- Dalton, C. B., and others. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N. Eng. J. Med. 336: 100-105.
- Dillon, R., Patel, T., and Ratnam, S. 1994. Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products. Int. J. Food Microbiol. 22: 73-77.
- Dons, L., Rasmussen, O. F., and Olesen, J. E. 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *L. monocytogenes*. Mol. Microbiol. 6: 2919-2929.
- Duffy, L. L., Vanderlinde, P. B., and Grau, F. H. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. Int. J. Food Microbiol. 23: 377-390.
- Elson, R., Burgess, F., Little, C. L., and Mitchell, R. T. 2004. Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pate from catering and retail premises in the UK. J. Appl. Microbiol. 96: 499-509.
- Farber, J. M. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. J. Food Prot. 54: 922-924, 934.
- Farber, J. M., and Addison, C. J. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 77: 242-250.
- Farber, J. M., and Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511.

- Farber, J. M., and Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*. In Lund, B. M., Baird-Parker, A. C. and Gould, G. (eds.), The Microbiology of Food, pp. 1178-1232. London: Chapman and Hall, 2000.
- Farber, J. M., Ross, W. H., and Harwig, J. 1996. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. Int. J. Food Microbiol. 30: 145–156.
- FDA/FSIS. Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. [online]. 2001. Available from: <http://www.foodsafety.gov/ds/lmrisk.html> [2010 October 4]
- Fenlon, D. R. 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bacteriol. 59: 537-543.
- Foegeding, P. M. 1997. Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety. Int. J. Food Microbiol. 36: 87-95.
- Fonnesbech Vogel, B., Jørgensen, L. V., Ojeniyi, B., Huss, H. H., and Gram, L. 2001. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by random amplified polymorphic DNA analyses. Int. J. Food Microbiol. 65: 83-92.
- Frederiksen, W. *Listeria* epidemiology in Denmark 1981-1990. Laval, France: ASEPT Editeur/Rue des Docteurs Calmette et Guerin, 1991.
- Gedde, M. M., Higgins, D. E., Tilney, L. G., and Portnoy, D. A. 2000. Role of listeriolysin-O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 68: 999-1003.
- Gellin, B. G. and Broome, C. V. 1989. Listeriosis. JAMA. 261: 1313-1320.
- Gilbert, S., Lake, R., Hudson, A., and Cressey, P. Risk Profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. [online]. 2009. Available from: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/listeria-in-rte-meat.pdf> [2010, August 21]
- Gilot, P., and Content, J. 2002. Specific identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR assays targeting a gene encoding a fibronectin-binding protein. J. Clin. Microbiol. 40: 698-703.

- Giovannacci, I., and others. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int. J. Food Microbiol. 53: 127–140.
- Gitter, M. 1976. *Listeria monocytogenes* in 'oven-ready' poultry. Vet. Rec. 99: 336.
- Goulet, V., and others. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. Lancet. 345: 1581-1582.
- Gudbjornsdottir, B., and others. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries. Food Microbiol. 21: 217-225.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nature Reviews Microbiology. 4: 423-434.
- Haas, C. N., Madabusi, A. T., Rose, J. B., and Gerba, C. P. 1999. Development and validation of dose response relationship from *Listeria monocytogenes*. Quant. Microbiol. 1: 89–102.
- Heir, E., and others. 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. Int. J. Food Microbiol. 96: 85-96.
- Hitchins, A. D. 1996. Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 30: 71-85.
- Hofer, E., Ribeiro, R., and Feitosa, D. P. 2000. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 95: 615-620.
- Hoffman, A. D., Gall, K. L., Norton, D. M., and Wiedmann, M. 2003. *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. J. Food Prot. 66: 52-60.
- Hoonstra, E., and Notermans, S., 2001. Quantitative microbiological risk assessment. Int. J. Food Microbiol. 66: 21 – 29.
- Hudson, J. A. 1992. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 14: 178-180.

- ICMSF. Micro-organisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens. New York: Blakie Academic and Professional, 1996.
- ICMSF. Microorganisms in foods 7: microbiological testing in food safety management. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
- Jay, J. M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control. 7: 209-214.
- Johnsen, B. O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E. H., and Nordøy, I. 2010. A Large Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infection With Short Incubation Period In A Tertiary Care Hospital. J. Infection. Article in Press.
- Johnson, J. L., Doyle, M. P., and Cassens, R. G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. J. Food Prot. 53: 81-91.
- Karches, H., and Teufel, P. 1988. *Listeria monocytogenes* Vorkommen in Hackfleisch and Verhalten in frischer Zwiebel mettwurst. Fleischwirtsch. 68: 1388-1392.
- Kathariou, S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food Prot. 65: 1811–1829.
- Kerouanton, A., and others. 1998. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 43: 61–71.
- Kerr, K. G., Birkenhead, D., and Seale, K. 1993. Prevalence of *Listeria* spp. on the hand of food workers. J. Food Prot. 56: 525-527.
- Kerr, K. G., Kite, P., Heritage, J., and Hawkey, P. M. 1995. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. J. Food Prot. 58: 609-613.
- Koutsoumanis, K. P., and Sofos, J. N. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* after habituation at different pH conditions. Lett. Appl. Microbiol. 38: 321-326.
- Lawrence, L., and Gilmour, A. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by

- random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2139-2144.
- Lekroengsin, S., Keeratipibul, S., and Trakoonlerswilai, K. 2007. Contamination profile of *Listeria* spp. in three types of ready-to-eat chicken meat products. J. Food Prot. 70: 85-89.
- Lin, A. W., Usera, A., Barrett, T. J., and Goldsby, R. A. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. J. Clin. Microbiol. 34: 870-876.
- Lindqvist, R., and Westöö, A. 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon/rainbow trout in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 58: 181-196.
- Linnan, M. J., and others. 1988. Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. N. Engl. J. Med. 319: 823-828.
- Little, C. L., Barrett, N. J., Grant, K., and McLauchlin, J. 2008. Microbiological safety of sandwiches from hospitals and other health care establishments in the United Kingdom with a focus on *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. J. Food Prot. 71(2): 309-318.
- Lopez, V., and others. 2008. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. Meat Sci. 78: 130-134.
- Lorber, B. 1997. Listeriosis. Clin. Infect. Dis. 24: 1-11.
- Lundén, J. M., Autio, T. J., and Korkeala, H. J. 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. J. Food Prot. 65: 1129-1133.
- Lynch, M., Painter, J., Woodruff, R., and Braden, C. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks --- United States, 1998 - 2002. [online]. 2006. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/ss/ss5510.pdf> [2010, September 11]
- Lyytikäinen, O., and others. 2000. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. J. Infect. Dis. 181(5):1838-41.

- MacGowan, A.P., Bowker, K., and Mclauchlin, J. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought foodstuffs, human faces, sewage and soil from urban sources. Int. J. Food Microbiol. 21: 325-334.
- MacGowan, A. P., O'Donaghue, K., Nicholls, S., Mclauchlin, J., Bennett, P. M., and Reeves, D.S. 1993. Typing of *Listeria* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Med. Microbiol. 38: 322-327.
- MAFF. Microbiological survey – ready to eat meats and meat products. [online]. 1997. Available from: <http://www.foodstandards.gov.uk/maff/archive/food/bulletin/1997/no85/rtemeat.htm> [2010, September 11]
- Mead, P. S., and others. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5: 607-625.
- Miettinen, M. K., Björkroth, K., and Korkeala, H. J. 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 46: 187-192.
- Niederhauser, Ch., Hofelein, Ch., Allmann, M., Burkhalter, P., Luthy, J., and Candrian, U. 1994. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. J. App. Bacterio. 77: 574-582.
- Nørrung, B. 2000. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. Int. J. Food Microbiol. 62: 217-221.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., and Chackraborty, T. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 61: 244–248.
- Odumeru, J. A., Belvedere, J., and Van Donkersgoed, C. 2004. Evaluation of the MicroFoss system for the detection of *Listeria* species in environmental samples. J. Microbiol. Meth. 57: 1-7.
- Ojeniyi, B., Christensen, J., and Bisgaard, M. 2000. Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey

- products, and from human cases of listeriosis in Denmark. Epidemiol. Infect. 125(2): 303-308.
- Orndorff, P. E., Hamrick, T. S., Smoak, I. W., and Havell, E. A. 2006. Host and bacterial factors in Listeriosis pathogenesis. Vet. Microbiol. 114: 1-15.
- Pan, Y., Breidt, F., Jr., and Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7711-7717.
- Pociecha, J., Smith, Z., and Manderson, G. 1991. Incidence of *Listeria monocytogenes* in meat production environments of a South Island (New Zealand) mutton slaughterhouse. Int. J. Food Microbiol. 13: 321-327.
- Portnoy, D. A., Jacks, P. S., and Hinrichs, D. J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. J. Exp. Med. 167: 1459-1471.
- Pritchard, T. J., Flanders, K. J., and Donnelly, C. W. 1995. Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. Int. J. Food Microbiol. 26: 375-384.
- Riedo, F. X., and others. 1994. A point-source foodborne outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J. Infect. Dis. 170: 693-696.
- Roberts, D., and Pinner, R. Economic impact of disease cause by *L. monocytogenes*. In Miller, A., Smith, J., and Somkuti, G. (eds.), Topics in industrial microbiology: food borne Listeriosis, pp. 137-149. New York: Elsevier Science Publishing, 1990.
- Rocourt, J. 1988. Taxonomy of genus *Listeria*. Infection. 16: 89-91.
- Rocourt, J., and Bille, J. 1997. Foodborne Listeriosis. World Health Stat. Q. 50: 67-73.
- Rocourt, J., and others. 1993. Epidemic e listeriose a lysovar 2671-108-312 en France. Resultats prelininares de l'enquete epidemiologique coordonnee par le reseau national de santé publique. Bull. Epidemiol. Hebd. 34: 157-158.
- Ryser, E. T., Arimi, S. M., Bunduki, M. M., and Donnelly, C. W. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat

- and poultry products with two primary enrichment media. Appl. Environ. Microbiol. 62(5): 1781-1787.
- Ryser, E. T., Arimi, S. M., and Donnelly, C. W. 1997. Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay and grass silage. Appl. Environ. Microbiol. 63 (9): 3695-3697.
- Salamina, G., and others. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 117: 429-436.
- Salvat, G., Toquin, M. T., Michel, Y., and Colin, P. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a Listeriosis outbreak in France. Int. J. Food Microbiol. 25: 75-81.
- Skovgaard, N., and Morgan, C. A. 1998. Detection of *Listeria* spp. In faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 6: 229-242.
- Swissinfo. Listeria outbreak under control. [online]. 2005. Available from: http://www.swissinfo.ch/eng/Listeria_outbreak_under_control.html?cid=4548976 [2010, September 11]
- Thimothe, J., Walker, J., Suvanich, V., Gall, K. L., Moody, M. W., and Wiedmann, M. 2002. Detection of *Listeria* in crawfish processing plants and in raw, whole crawfish and processed crawfish (*Procambarus* spp.). J. Food Protect. 65 (11): 1735-1739.
- Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J. Food Prot. 65: 709-725.
- Tompkin, R. B., Scott, V. N., Bernard, D. T., Sveum, W. H., and Gombas, K. S. 1999. Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. Dairy Food Environ. Sanit. 19: 551-552.
- Trott, D., Seneviratna, P., and Robertson, J. 1991. *Listeria* in cooked chicken, pate and mixed smallgoods. Aust. Vet. J. 68(7): 249-250.

- Unnerstad, H., Bannerman, E., Bille, J., Danielsson-Tham, M. L., Waak, E., and Tham, W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. Neth. Milk Dairy J. 50: 493-499.
- Van de Elen, A. M. G., and Snijders, J. A. 1993. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. Vet. Quart. 15: 143-145.
- Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M. J., and Dony, J. 1993. Bactericidal activity of disinfectants on *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 74(4): 480-483.
- Van Renterghem, B., Huysman, F., Rygole, R., and Verstraete, W. 1991. Detection and Prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agriculture ecosystem. J. Appl. Bacteriol. 71: 211-217.
- Varabioff, Y. 1992. Incidence of *Listeria* in smallgoods. Lett. Appl. Microbiol. 14: 167-169.
- Vasseur, C., Rigaud, N., Hebraud, M., and Labadie, J. 2001. Combined effects of NaCl, NaOH, and biocides (monolaurin or lauric acid) on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. J. Food Prot. 64(9): 1442-1445.
- Victoria, R. L., and others. 2004. Impact of intervention strategies on *Listeria* contamination patterns in crawfish processing plants: a longitudinal study. J. Food Prot. 67: 1163-1169.
- Wang, G. H., Yan, K. T., Feng, S. M., Chen, S. M., Lui, A. P., and Kokubo, Y. 1992. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail meats in Beijing. J. Food Prot. 55: 56-58.
- Warburton, D., Boville, A., Pagotta, F., Daley, E., and Chow, C. The detection of Listeria spp. in foods and environmental samples using PALCAM broth. [online]. 2003. Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment> [2010, August 21]
- Welshimer, H. J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bacteriol. 80: 316-320.
- Wernars, K., Heuvelman, C. J., Chakraborty, T., and Notermans, S. H. W. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. J. Appl. Bacteriol. 70: 121-126.

- WHO/FAO. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. [online]. 2004. Available from: http://www.who.int/food_safety/publications/micro/en/mra4.pdf [2010 October 4]
- Whyte, P., McGill, K., Monahan, C., and Collins, J. D. 2004. The effect of sampling time on the levels of micro-organisms recovered from broiler carcasses in a commercial slaughter plant. Food Microbiol. 21: 59-65.
- Winter, P., and Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 438-448.
- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., and Vogel, B. F. 2006. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4313-4322.
- Yucel, N., Citak S., and Gundogan N. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw meat. Indian Vet. J. 81: 1192-1194.
- Zhao, T., and others. 2006. Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3314-3320.

ภาคผนวก

ภาคผนวก
วิธีวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์การมีอยู่ของ *Listeria* spp. ตามวิธี VIDAS® *Listeria* (LIS)

อุปกรณ์

Flask ขนาด 250 ml
Sterile pipette ขนาด 1 และ 10 ml
Petri dish
ก้าน swab
หลอดทดลอง
Glass slide
Loop
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
Stomacher
Incubator 30-32 °C
Incubator 35-37 °C
กล้องจุลทรรศน์

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Half Fraser broth
Fraser broth
Oxford agar
Ottaviani Agosti agar
TSAYE (Tryptone soya agar + 0.6% Yeast extract)
TSYE (Tryptone soya + 0.6% Yeast extract) broth
Hydrogen peroxide
Gram stain reagent

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 25 g ด้วยวิธี aseptic technique หรือตัวอย่าง swab 1 ml ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Half Fraser broth ปริมาตร 225 ml ผสมให้เข้ากันด้วย stomacher หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
2. Pipette ตัวอย่างจากข้อ 1 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth ปริมาตร 10 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
3. Pipette ตัวอย่างจากข้อ 2 ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดทดลองให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ $95 - 100$ °C เป็นเวลา 15 นาที (เก็บตัวอย่างที่ยังไม่ได้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ $2 - 8$ °C สำหรับการยืนยันผลในกรณีที่เกิดการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง VIDAS® เป็น positive)
4. วางตัวอย่างจากข้อ 3 ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว pipette ตัวอย่าง 0.5 ml ลงในหลอดของ VIDAS® strip
5. วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง VIDAS® ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที
6. การอ่านผล : < 0.1 แสดงว่าไม่พบเชื้อ *Listeria*
 $>$ หรือเท่ากับ 0.1 ให้ดำเนินการยืนยันผล
7. ใช้ก้าน swab จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fraser broth ที่บ่มแล้วในข้อ 2 แล้วลากก้าน swab บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Oxford agar และ Ottaviani Agosti agar เป็นบริเวณ ครึ่งหนึ่งของ petri dish ให้ทั่ว จากนั้นใช้ loop มา streak ให้ทั่วทั้ง plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะที่คาดว่าจะ เป็น *Listeria* spp. ที่ตรวจพบบน Oxford และ Ottaviani Agosti agar อย่างน้อย 3 โคโลนี ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด (ถ้าพบน้อยกว่า 3 โคโลนีให้เลือกมาทั้งหมด)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น <i>Listeria</i> spp.
Oxford agar	โคโลนีขนาด 1 mm สีเทา มี clear zone สีดำรอบๆ
Ottaviani Agosti agar	โคโลนีขนาด 1 mm สีเขียวฟ้าหรือฟ้าอ่อน ถ้าเป็น <i>L. monocytogenes</i> จะมี clear zone สีขาวขุ่นรอบๆด้วย

9. ใช้ loop เขี่ยโคโลนีที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 8 มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

10. การยืนยันผล

10.1 Catalase test

หยด hydrogen peroxide 3% ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากข้อ 9 มาผสมลงในสารละลาย สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที ผลเป็น positive ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ผลเป็น negative

10.2 Gram staining

ทำการย้อมสี gram stain เชื้อที่ได้จากข้อ 9

10.3 การอ่านผล

การทดสอบ	<i>Listeria</i> spp.
Catalase test	ผลเป็น positive
Gram staining	ติดสี gram positive มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น

2. การวิเคราะห์ชนิดของ *Listeria* spp. ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 11290-1:1996

อุปกรณ์

Flask ขนาด 250 ml

Petri dish

หลอดทดลอง

Loop

เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง

Stomacher

Incubator 25 °C

Incubator 35-37 °C

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

TSYE (Tryptone soya + 0.6% Yeast extract) broth

Sheep blood agar

Carbohydrate utilization broth (rhamnose และ xylose)

เชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

Staphylococcus aureus

Rhodococcus equi

วิธีทดลอง

1. Haemolysis test

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากภาคผนวกข้อ 1 วิธีทดลองข้อ 9 มา streak บน sheep blood agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

ถ้าผลเป็น positive จะเกิด clear zone รอบๆ โคลินี้ ถ้าผลเป็น negative จะไม่เกิด clear zone

2. Carbohydrate utilization

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากภาคผนวกข้อ 1 วิธีทดลองข้อ 9 แล้วถ่ายลงใน TSYE broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นความขุ่นของ TSYE broth จากนั้นใช้ loop ถ่ายเชื้อลงใน carbohydrate utilization broth (rhamnose และ xylose) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 °C เป็นเวลา 5 วัน (โดยทั่วไปปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นภายใน 24 – 48 ชั่วโมง)

ถ้าผลเป็น positive อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าผลเป็น negative อาหารเลี้ยงเชื้อจะยังคงมีสีแดงเหมือนเดิม

3. CAMP test (Christie Atkins Munch-Peterson test)

ใช้ loop เขี่ยเชื้อ *S. aureus* และ *R. equi* จาก working reference culture แล้วลากเป็นเส้นตรงในแนวขนานกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar จากนั้นเขี่ยเชื้อจากภาคผนวกข้อ 1 วิธีทดลองข้อ 9 มา streak ให้อยู่ระหว่างเชื้อมาตรฐานทั้ง 2 ชนิด โดยมีระยะห่างประมาณ 1 – 2 mm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 °C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

ถ้าผลเป็น positive การเกิด haemolysis ของเชื้อที่ทดสอบจะขยายเพิ่มขึ้น ใกล้ *S. aureus* และ *R. equi* โดยสำหรับ *R. equi* จะมีรูปร่างคล้ายหัวลูกศร ถ้าผลเป็น negative การเกิด haemolysis จะไม่ขยายเพิ่มขึ้นใกล้ *S. aureus* หรือไม่เกิดเลย และการเกิด haemolysis จะขยายเพิ่มขึ้นใกล้ *R. equi* แต่ไม่เป็นรูปหัวลูกศรหรือไม่เกิดเลย

4. การอ่านผล

ชนิดของ <i>Listeria</i>	ผลการทดสอบ				
	Heamolysis	Carbohydrate utilization		CAMP test	
		Rhamnose	Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	v ^a	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	v	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-

^a variable reaction

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรณิดา เตชะหุริจิตร เกิดเมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม 2528 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Keeratipibul, S., Meethong, S., Techaruwichit, P., and Thephuttee, N. 2010. Prevalence of *Escherichia coli* and Enterococci in a Thai Frozen Cooked Chicken Plant, and Modeling of the Cleaning and Sanitizing Procedure. Food Control. 21, 1104–1112.

Keeratipibul, S., Oupaichit, T., and Techaruwichit, P. 2009. Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products. Journal of Food Protection. 72(9), 1821-1829.

Suwimon Keeratipibul, Punnida Techaruwichit and Yuphakun Chaturongkasumrit. 2009. Contamination Sources of Coliforms in Two Different Types of Frozen Ready-to-Eat Shrimps. Food Control. 20(3), 289-293.

กิจกรรมทางวิชาการที่เข้าร่วม

การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 18 ณ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์ (NIDA). 2553

การสัมมนาเรื่อง “การจัดการความเสี่ยงและการจัดการอันตรายจากจุลินทรีย์ในอาหาร” ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น และภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางภาพถ่ายและเทคโนโลยีทางการพิมพ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553

กิจกรรมโครงการ “เบทาโกรร่วมสร้างแนวคิดอาหารปลอดภัยเพื่อคนรุ่นใหม่ ครั้งที่ 1” (BETAGRO Food Safety Academy #1) ณ อาคารเบทาโกร และป่าสัก ฮิลไซด์ รีสอร์ทท. 2552

- การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Intermediate Course on Risk Assessment and Its Tools” ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC), กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2552
- การสัมมนาเรื่อง “2009 International Molecular Methods in Food Microbiology” ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2552
- การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง “APEC Food Defense Pilot Project” ด้วยความร่วมมือจากหน่วยงาน U.S. Food and Drug Administration (USFDA) และภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2552
- การประชุม Food Hygienic Society of Japan. ผลงานที่เข้าร่วมประชุม (No. 95) “Contamination Profile of Coliforms in Cooked Ready-to-Eat Shrimps Produced in a Thai Food Processing Plant” ณ เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น. 2551